

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

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

要約

既存化学物質安全性調査事業の一環として、2-アミノ-5-メチル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、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により用量設定試験および本試験を行った。用量設定試験を50~5000 µg/プレートの用量で行ったところ、すべての検定菌においてS9 mix無添加試験および添加試験のいずれも抗菌性は認められなかった。したがって、本試験ではS9 mix無添加試験および添加試験を313~5000 µg/プレートの範囲で用量を設定して実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、2-アミノ-5-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。

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¹⁾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。

E. coli WP2 *uvrA*株²⁾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ものを、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で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-メチルベンゼンスルホン酸(CAS No. 88-44-8)は、分子量187.22の微黄白色粉末である。試験

には、三星化学業(株)製[ロット番号:4231, 純度98%以上(不純物:パラトルイジン200 ppm程度)]を、(株)日本化学工業協会から供与され、使用時まで冷蔵保管し、使用した。

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸は、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性がよいことから、DMSOに50 mg/mlになるように溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のDMSO溶液中での安定性試験および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、本試験IIで調製した低濃度(3.13 mg/ml)溶液および高濃度(50.0 mg/ml)溶液について、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均値に対して、99.3および100%であった。また、含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、高濃度は99.4%、低濃度は100%であった。

〔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。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF2, 2AAはDMSOに溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地およびS9 mixの組成〕

1) トップアガー

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

D-ビオチン 0.5 mM

*:WP2 *uvrA*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)製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	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 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 mix

1 ml中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

** : 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を用いた。

〔試験方法〕

プレート法により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 ml、リン酸緩衝液0.5 ml (S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 ml)、検定菌液0.1 mlおよびトップアガー2 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使用溶媒、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各Table中に示した。培養は37℃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、溶媒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、結果の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S9 mix無添加あるいはS9 mix添加条件において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒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〕

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸について50~5000 μg/プレートの範囲で公比を約3として、試験を実施したところ、すべての検定菌においてS9 mix無添加試験および添加試験のいずれも抗菌性は認められなかった。

〔本試験〕

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸について、2回の本試験の結果をそれぞれTable 1, 2に示した。用量を、S9 mix無添加試験および添加試験とともに313~5000 μg/プレートの範囲で公比を2として試験を実施した。その結果、2回の試験のいずれも、用いた5種類の検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験において、溶媒対照値の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。

以上の結果に基づき、2-アミノ-5-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, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173, (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹

試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子,
清水ゆり, 松木容彦, 中込まどか,
阿部昌弘

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257 秦野市落合 729-5

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

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)

Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
Kumiko Kawakami, Yuri Shimizu,
Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi
and Masahiro Abe

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. Mutagenicity of 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid** in reverse mutation test (1) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, Mean \pm S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	97 114 127 (113 \pm 15.0)	11 18 9 (13 \pm 4.7)	29 21 23 (24 \pm 4.2)	28 14 21 (21 \pm 7.0)	11 14 9 (11 \pm 2.5)	
	313	122 121 93 (112 \pm 16.5)	15 18 21 (18 \pm 3.0)	35 27 38 (33 \pm 5.7)	25 25 35 (28 \pm 5.8)	13 11 13 (12 \pm 1.2)	
	625	95 114 112 (107 \pm 10.4)	11 11 6 (9 \pm 2.9)	30 23 22 (25 \pm 4.4)	11 21 34 (22 \pm 11.5)	4 12 13 (10 \pm 4.9)	
	1250	110 110 98 (106 \pm 6.9)	16 15 14 (15 \pm 1.0)	25 21 30 (25 \pm 4.5)	28 26 20 (25 \pm 4.2)	9 16 9 (11 \pm 4.0)	
	2500	97 106 108 (104 \pm 5.9)	17 12 12 (14 \pm 2.9)	25 23 17 (22 \pm 4.2)	29 23 14 (22 \pm 7.5)	13 11 12 (12 \pm 1.0)	
	5000	114 133 114 (120 \pm 11.0)	4 20 19 (14 \pm 9.0)	28 27 25 (27 \pm 1.5)	20 36 28 (28 \pm 8.0)	13 7 10 (10 \pm 3.0)	
S9mix (+)	0	124 127 132 (128 \pm 4.0)	15 12 12 (13 \pm 1.7)	28 27 23 (26 \pm 2.6)	27 32 44 (34 \pm 8.7)	18 7 9 (11 \pm 5.9)	
	313	148 122 126 (132 \pm 14.0)	10 10 18 (13 \pm 4.6)	24 22 22 (23 \pm 1.2)	38 47 42 (42 \pm 4.5)	9 8 15 (11 \pm 3.8)	
	625	124 127 130 (127 \pm 3.0)	18 14 7 (13 \pm 5.6)	18 33 33 (28 \pm 8.7)	34 46 28 (36 \pm 9.2)	12 9 13 (11 \pm 2.1)	
	1250	125 134 118 (126 \pm 8.0)	12 20 21 (18 \pm 4.9)	25 22 19 (22 \pm 3.0)	22 36 33 (30 \pm 7.4)	16 9 10 (12 \pm 3.8)	
	2500	119 129 101 (116 \pm 14.2)	15 15 12 (14 \pm 1.7)	16 16 24 (19 \pm 4.6)	37 38 27 (34 \pm 6.1)	9 13 9 (10 \pm 2.3)	
	5000	133 113 134 (127 \pm 11.8)	21 18 18 (19 \pm 1.7)	18 26 30 (25 \pm 6.1)	25 30 30 (28 \pm 2.9)	17 11 11 (13 \pm 3.5)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	618 627 632 (626 \pm 7.1)	174 215 208 (199 \pm 21.9)	119 117 113 (116 \pm 3.1)	840 892 847 (860 \pm 28.2)	890 726 734 (783 \pm 92.5)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	1068 1025 1025 (1039 \pm 24.8)	270 272 221 (254 \pm 28.9)	1270 1435 1069 (1258 \pm 183.3)	450 432 416 (433 \pm 17.0)	328 294 362 (328 \pm 34.0)	

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

**: Purity was above 98 % and *p*-toluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

Table 2. Mutagenicity of 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid** in reverse mutation test (II) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, Mean \pm S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	120 114 135 (123 \pm 10.8)	20 17 14 (17 \pm 3.0)	23 32 30 (28 \pm 4.7)	30 32 20 (27 \pm 6.4)	17 16 23 (19 \pm 3.8)	
	313	134 118 102 (118 \pm 16.0)	14 9 12 (12 \pm 2.5)	21 18 24 (21 \pm 3.0)	30 32 18 (27 \pm 7.6)	18 26 25 (23 \pm 4.4)	
	625	106 115 135 (119 \pm 14.8)	20 17 9 (15 \pm 5.7)	21 26 36 (28 \pm 7.6)	24 29 28 (27 \pm 2.6)	24 33 26 (28 \pm 4.7)	
	1250	111 125 114 (117 \pm 7.4)	15 14 12 (14 \pm 1.5)	30 14 21 (22 \pm 8.0)	28 24 42 (31 \pm 9.5)	30 21 26 (26 \pm 4.5)	
	2500	122 101 117 (113 \pm 11.0)	17 14 11 (14 \pm 3.0)	10 11 13 (11 \pm 1.5)	35 23 31 (30 \pm 6.1)	23 32 22 (26 \pm 5.5)	
	5000	99 112 110 (107 \pm 7.0)	11 14 11 (12 \pm 1.7)	26 24 39 (30 \pm 8.1)	33 39 22 (31 \pm 8.6)	30 18 22 (23 \pm 6.1)	
S9 mix (+)	0	126 129 117 (124 \pm 6.2)	16 13 10 (13 \pm 3.0)	44 24 21 (30 \pm 12.5)	37 34 28 (33 \pm 4.6)	17 11 12 (13 \pm 3.2)	
	313	128 110 120 (119 \pm 9.0)	12 17 11 (13 \pm 3.2)	21 23 27 (24 \pm 3.1)	39 43 21 (34 \pm 11.7)	17 12 17 (15 \pm 2.9)	
	625	121 126 134 (127 \pm 6.6)	12 18 17 (16 \pm 3.2)	21 21 11 (18 \pm 5.8)	31 30 31 (31 \pm 0.6)	8 14 16 (13 \pm 4.2)	
	1250	128 114 141 (128 \pm 13.5)	9 16 16 (14 \pm 4.0)	29 21 22 (24 \pm 4.4)	24 33 39 (32 \pm 7.5)	7 10 17 (11 \pm 5.1)	
	2500	114 113 128 (118 \pm 8.4)	6 19 15 (13 \pm 6.7)	19 12 22 (18 \pm 5.1)	52 34 46 (44 \pm 9.2)	20 22 13 (18 \pm 4.7)	
	5000	97 116 160 (124 \pm 32.3)	14 11 15 (13 \pm 2.1)	19 19 15 (18 \pm 2.3)	38 38 46 (41 \pm 4.6)	20 12 14 (15 \pm 4.2)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	678 599 627 (635 \pm 40.1)	247 269 266 (261 \pm 11.9)	145 157 153 (152 \pm 6.1)	959 967 925 (950 \pm 22.3)	1963 2099 1748 (1937 \pm 177.0)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	1056 1405 1231 (1231 \pm 174.5)	291 292 293 (292 \pm 1.0)	1477 1388 1534 (1466 \pm 73.6)	501 502 487 (497 \pm 8.4)	287 280 283 (283 \pm 3.5)	

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

** : Purity was above 98 % and *p*-toluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

2-アミノ-5-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-methylbenzenesulfonic acid on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

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、2-アミノ-5-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/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)、短時間処理(6時間)ともに50%を越える増殖抑制濃度、すなわち1.9 mg/ml(10 mM)の濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した高濃度群(1.9 mg/ml)では、細胞毒性のため染色体を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix非存在下で6時間処理した高濃度群(1.9 mg/ml)において細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下では、高濃度群(1.9 mg/ml)において細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、中濃度群(0.95 mg/ml)において観察した細胞の7.0%に染色体異常が、また、1.38%に倍数性細胞の誘発が認められ陽性の結果が得られた。染色体構造異常や倍数性細胞の誘発作用が被験物質による培養液の酸性化による可能性が示唆されたため、確認試験を行った。その結果、pH調整後の短時間処理したS9 mix存在下では、いずれの濃度群においても染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸は、酸性化により染色体異常を誘発するが、DNAに直接作用して染色体異常を誘発することはないと結論した。

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、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU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: Biocell)を10%添加したイーグルMEM(日本製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたアイッシュ(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。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸(略号: AMBS, CAS No.: 88-44-8, ロット番号: 4231, 三星化学(株)製造, (株)日本化学工業協会提供)は、微黄白色粉末で、水に対して50 mg/100 ml(20°C)で溶解し、融点300°C以上、分子式C₇H₉NO₃S, 分子量187.22, 純度98%以上(不純物としてパラトルイジン200 ppm程度, 不明1.98%を含む)の物質である。

被験物質原体は、苛性ソーダ水溶液中ではNa塩となり溶解する。また、媒体中(0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液, 以下0.5% CMC Na水溶液と略す)では、4.75~19.0 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。媒体は0.5% CMC Na水溶液(ナカライテスク(株))を用いた。原体を媒体に懸濁して原液を調製し、ついで原液を媒体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、すべての試験において最終的に培養液の10%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(媒体中での平均含量が添加量の85.0~115%)の値であった。濃度の記載について、純度換算は行わなかった。なお、確認試験では、被験物質を含む培養液のpHを中性域に調整して試験を行った。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定す

るため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業株)を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の陰性対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%の増殖抑制濃度を明らかに超える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%増殖抑制濃度をささむ2濃度より算出したところ、1.7 mg/mlであった。また、短時間処理のS9 mix非存在下では、1.7 mg/mlであった。一方、S9 mix存在下では、10 mM(1.9 mg/ml)の濃度において57%の増殖抑制が認められた(Fig. 1)。

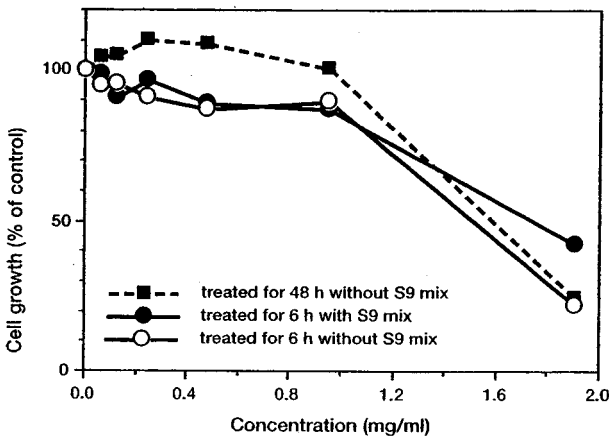


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果、連続処理と短時間処理のS9 mix非存在下における50%の増殖抑制濃度を明らかに超える濃度が、10 mMと近似していることから、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理とも1.9 mg/ml(10 mM)とし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業株)およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 µg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析し

た。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、陰性および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、林²⁾の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法³⁾(多重性を考慮してfamilywiseの有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定⁴⁾($p < 0.05$)を行った。原則として以上2回の検定でともに有意差が認められた場合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸を加えて、24時間および48時間連続処理した高濃度群(1.9 mg/ml)では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸を加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した高濃度群(1.9 mg/ml)では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかった。S9 mix非存在下のその他の処理群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下の中濃度群(0.95 mg/ml)では、観察した細胞の7.0%に染色体の構造異常(gapを含む)が、また、1.38%に倍数性細胞の誘発が認められ、陽性の結果が得られた。

培養液がpH 6.3以下の酸性条件下では、染色体異常が誘発される場合があることが報告⁵⁾されている。2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸を培養液に添加すると培養液の色が黄色化することから、処理直後と処理終了後の培養液のpHを測定したところ、陽性の結果が得られたS9 mix存在下の中濃度群では、処理直後のpHは5.84で、処理終了後では6.26であった。従って、本実験で誘発された染色体異常に関しては、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸それ自身によるDNA傷害作用に起因する可能性に加えて、2-アミノ-5-メチルベンゼン

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (AMBS)* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Trend test ⁵⁾		
												with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)		SA NA	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)			SA	NA
Control			200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25			
Vehicle ¹⁾	0	24	200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13			
AMBS	0.48	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			
AMBS	0.95	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	NT	NT	
AMBS	1.9	24	0 ^T											T			
MC	0.00005	24	200	5	51	81	1	1	0	139	2	97 (48.5)	93 (46.5)	0.13			
Vehicle ¹⁾	0	48	200	0	0	3	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.38			
AMBS	0.48	48	200	0	1	0	1	1	0	3	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13			
AMBS	0.95	48	200	4	1	0	0	1	0	6	0	6 (3.0)	2 (1.0)	0.25	NT	NT	
AMBS	1.9	48	51 ^T	2	24	4	0	0	430	460	1	51 (100)	51 (100)	3.36 ^{6)T}			
MC	0.00005	48	200	8	58	125	2	7	10	210	16	103 (51.5)	102 (51.0)	0.25			

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C, NT: not tested, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution was used as vehicle. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran · Armitage's trend test was done at $p < 0.05$ when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at $p < 0.05$ by Fisher's exact test. 6) One hundred and nineteen cells were analysed. *: Purity was more than 98%. Paratoluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (AMBS)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Trend test ⁵⁾		
													with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)		SA NA	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)			SA	NA
Control				200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.75			
Vehicle ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.63			
AMBS	0.48	-	6-(18)	200	1	0	0	1	1	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.25			
AMBS	0.95	-	6-(18)	200	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25	NT	NT	
AMBS	1.9	-	6-(18)	0 ^T											T			
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			
Vehicle ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	1	2	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.38			
AMBS	0.48	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			
AMBS	0.95	+	6-(18)	200	0	19	23	0	0	0	42	0	14* (7.0)	14 (7.0)	1.38*	+	+	
AMBS	1.9	+	6-(18)	5	0	4	6	0	0	0	10	0	4 (80.0)	4 (80.0)	0.00 ^{6)T}			
CPA	0.005	+	6-(18)	200	5	66	189	1	5	20	286	3	122 (61.0)	122 (61.0)	0.25			

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide, NT: not tested, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution was used as vehicle. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran · Armitage's trend test was done at $p < 0.05$. 6) Five cells were analysed. *: Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyploid at $p < 0.05$ by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **: Purity was more than 98%. Paratoluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with pH-adjusted 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (AMBS)* under presence of S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	3	2	0	0	0	5	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.75		
AMBS ⁶⁾	0.48	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38		
AMBS	0.95	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	NT	NT
AMBS	1.9	+	6-(18)	200	2	6	0	0	1	0	9	0	6 (3.0)	4 (2.0)	0.13		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	6	71	169	6	1	0	253	0	123 (61.5)	121 (60.5)	0.25		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide, NT: not tested. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05 when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical data of negative control (vehicle) at p<0.05 by Fisher's exact test. 6) The pH of treatment solution was adjusted with 0.1 N NaOH before adding to the dish. *: Purity was more than 98%. Paratoluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

スルホン酸添加による培養液の酸性化による可能性が考えられた。このため、確認試験を行った。

確認試験における、S9 mix 存在下の短時間処理による染色体分析の結果を Table 3 に示した。2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸を加えて pH 調整後に、S9 mix 存在下で 6 時間処理したすべての処理群において染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。処理時における培地の pH は、溶媒対照、各処理群とも pH 6.80~7.19 を示した。

以上の結果より、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸は、培地の酸性化により、染色体異常を誘発するが、pH 調整によって中性条件下で処理すると染色体異常を誘発しないと結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 林 真, 変異原性試験, 1, 255 (1992).
- 3) 吉村 功 編著, "毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ," サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 4) 吉村 功, 大橋靖夫 編, "毒性試験講座 14, 毒性試験データの統計解析," 地人書館, 東京, 1992.
- 5) T. Morita, et al., *Mutation Res.*, 268, 297 (1992).

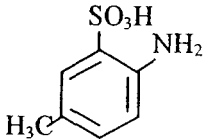
連絡先

試験責任者: 田中憲穂
 試験担当者: 山影康次, 若栗 忍, 日下部博一,
 橋本恵子, 太田 亮
 (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

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
 Kohji Yamakage, Shinobu Wakuri,
 Hirokazu Kusakabe, Keiko Hashimoto,
 Ryo Ohta
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE

CAS No.	88-44-8
Chemical Name	4-Aminotoluene-3-sulfonic acid
Structural Formula	

SUMMARY CONCLUSIONS OF THE SIAR**Human Health**

From the outcome of a single dose administration reported in a preliminary examination of a 28-Day Repeat Dose Toxicity study [OECD TG407], the oral LD50 in rats is considered to be greater than 2000 mg/kg in both sexes. This substance was not corrosive or irritant to human skin.

In the 28-Day Repeated Dose Toxicity study [OECD TG407], this substance was administered to male and female rats at 0, 100, 300, 1000 mg/kg/day dose by gavage. At 1000 mg/kg/day in males, a decrease of white blood cell count, total cholesterol and urine pH, also an enlargement of cecum were observed. At 1000 mg/kg in females, an increase of GPT and a decrease of glucose, also an enlargement of cecum were observed. All of those changes recovered within 14 days after cessation of the treatment. No other dose-dependent histopathological changes were observed in any dose groups. No changes in mortality, behavior or toxic effects on the body weight and food consumption were observed in any dose levels and in any sexes. The NOAEL for both sexes is considered to be 300 mg/kg/day.

This substance was not mutagenic in bacteria up to 5,000 ug/plate [OECD TG471, TG472] and 10,000 ug/plate. A chromosomal aberration test tested up to 1.9 mg/mL (10mM) [OECD TG473] was negative except in the 6hr short-term test in the presence of an exogenous metabolic activation system. The positive response in the 6 hr short term test was based on the low pH, because the induction of chromosomal aberration was diminished after adjustment of the pH to a neutral range. The result of an unscheduled DNA synthesis up to 187 mg/L was negative. Furthermore, an *in vivo* micronucleus test was negative. Overall, this substance can be considered to be not genotoxic *in vitro* and *in vivo*.

In a Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test [OECD TG421], this substance was administered to male and female rats at 0, 100, 300, 1000 mg/kg/day dose by gavage for 48 days in males and 41 – 46 days (from 14 days before mating to 3 days after parturition) in females. No compound-related dose effects were observed in the copulation index, fertility index, gestation length, number of corpora lutea or implantations, implantation index, gestation index and maternal behavior. As for pups, there were no significant differences in number of offspring or live offspring, sex ratio, the live birth index, the viability index or the body weight. No pups with malformations were found in any groups. No changes in clinical signs and necropsy findings were observed in offspring. From those results, the NOAEL for reproductive and developmental toxicity is considered to be 1000 mg/kg/day.

Environment

This substance is soluble in water (6.0 g/L at 20°C) and the vapor pressure is low (< 0.00052 Pa at 100°C) [OECD TG104]. This substance was not readily biodegradable (0% after 14 days on BOD) [OECD TG301C] and is stable to hydrolysis in water at pH 4, 7 and 9 [OECD TG111]. The bioconcentration potential is low (BCF < 4 (0.2 mg/L) and < 0.4 (2 mg/L)) [OECD TG305C]. The log Pow is -0.67 at 25°C [OECD TG107]. This substance, if released into the atmosphere, will react with photochemically produced hydroxyl radical and decrease with a half-life of 4.5 hours. The pKa value of this substance is 3.28. It is present as a zwitterion under environmental condition. The behavior of this substance in the environment is considered to be similar to a weak acid.

The fugacity model (Mackay level III) suggests that if released to water, the majority of the substance would remain in the water compartment and, if released into air or soil, ca.50% would distribute to both water and the soil compartment.

In an acute toxicity test to fish, the LC50 was greater than 10 mg/L (*Oryzias latipes*, 96hr limit test) [OECD TG203].

In an acute toxicity test to daphnia, the EC50 was greater than 10 mg/L (*Daphnia magna*, 48hr limit test) [OECD TG202].

In an acute toxicity test to algae, the EC50 was greater than 10 mg/L (*Selenastrum capricornutum*: 0 – 72 hr biomass, and 24 – 72 hr growth rate) [OECD TG201].

In a chronic toxicity test to daphnia, the NOEC was 3.2 mg/L (*Daphnia magna*, 21 days reproduction) [OECD TG211] and in a chronic toxicity test to algae, the NOEC was 10 mg/L (*Selenastrum capricornutum*: 0 – 72 hr biomass, and 24 – 72 hr growth rate) [OECD TG201].

Exposure

The production volume of this substance in 2001 is estimated to be 2,000 - 3,000 metric tonnes/year in Japan and ca.18,000 metric tonnes/year in the world. The production countries are Japan, Korea, P.R. China, United Kingdom and U.S.A. In total there are about 20 manufacturing sites and about 55 use sites in the world.

This substance is produced in closed systems, and the packing process is performed in semi-closed or open systems. The user may use it in semi-closed systems. The only recognized use is as an industrial intermediate in the synthesis of organic pigments (Pigment Red 57 and its metal salts). These pigments are utilized in ink, paint, stationery goods, cosmetic goods and for the coloring of resin, fiber, leather, paper, rubber, etc. The concentration of the non-reacted parent substance in pigments is not known, but the consumer exposure is thought to be insignificant. There are no known direct uses of this substance in any consumer product. In the case of cosmetic goods (lip stick, etc.), regulations are in place in each region, for example the content of the substance in the colouring agent must be less than 0.2 % in the USA. Therefore, the possibility of consumer exposure from cosmetic goods is considered to be low.

Because of its use limited to the pigment industry and its low vapor pressure, the release of this substance into air and soil is very low. The concentration of this substance in effluent water from waste water treatment plant of manufacturer in Japan is less than 0.009 mg/L. The total emission from manufacturer's site through water in Japan is calculated to be less than 5 kg/year.

Based on the use and the properties of the substance, only occupational exposure by inhalation and dermal routes need to be considered.

RECOMMENDATION

The chemical is currently of low priority for further work.

RATIONALE FOR THE RECOMMENDATION AND NATURE OF FURTHER WORK RECOMMENDED

This chemical is currently of low priority for further work because of its low hazard potential.