



2-(ジエチルアミノ)エチル=メタクリレート
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
材料および方法	3
結果および考察	7
結 論	7
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1~3	

【要 約】

2-(ジエチルアミノ)エチル=メタクリレートの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、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インキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、WP2 *uvrA* のS9 mix 無添加試験を除いて、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められた。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最高用量を5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として公比2で5~6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-(ジエチルアミノ)エチル=メタクリレートは、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。

【 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、2-(ジエチルアミノ)エチルメタクリレートについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾により実施した。

この試験は、サルモネラ菌（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突然変異²⁾、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突然変異³⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素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 S9 mix 添加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毒性試験ガイドライン：471、472」に準拠し、「化学物質GLP基準」（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

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°C 以下で凍結保存したものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性および膜変異 (*rfa*) とアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントプロス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°C で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。試験に用いた各検定菌液の濁度を Appendix 1 に示した。

〔被験物質〕

2-(ジエチルアミノ)エチル=メタクリレート (略称: DAEMA、CAS No. 105-16-8) は、分子量 185.27 の無色透明液体である。構造式等は Appendix 2 に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99.8% [不純物: 470ppm 安定剤 (MEHQ)、0.03% 水分、0.02% MMA、0.11% アルコール] であり、

から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。本ロットについては、試験期間中安定であることを確認した。

DAEMA は、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: DLF7632、和光純薬工業株) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

〔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) 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%以上)
9AA	: 9-アミナクリジン (Sigma Chem. Co. ロット番号 96F05641, 純度98%以上)
2AA	: 2-アミアントラセン (和光純薬工業(株) ロット番号 DSF2950, 純度90%以上)

AF2 および 2AA は DMSO に溶解したものを -20°C で凍結保存し、用時解凍した。

9AA は DMSO に、SA は超純水に溶解し、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 (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%	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、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号: HY1604、1996年10月25日製造、および HY2001、1997年2月7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	水酸化ナトリウム	0.66 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 (清水食品)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g		

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 ml を流して固めたものである。

3) S9 mix (1 ml中下記の成分を含む)

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

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットにフェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与を行い、酵素誘導して作製された S9 (キッコマン(株)、ロット番号: RAA-355、1996年11月22日製造および RAA-359、1997年2月21日製造)を購入し、-80°Cで凍結保存し、用時に解凍して用いた。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、肝臓の摘出および S9 の調製は5日目。

[試験方法]

プレインキュベーション法により、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 を混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、トッパアガー 2 mlを加えて混和し、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。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。培養は37°Cで48時間行い、生じた変異コロニー数を目視またはコロニーカウンターを用いて算定した。抗菌性の有無については、肉眼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〕

結果の判定に統計学的手法は用いないこととした。

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、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、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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もの（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〕

DAEMAについて 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 として、試験を実施した (Table 1)。その結果、WP2 *uvrA* の S9 mix 無添加試験を除いて、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として公比 2 で 5~6 用量を設定して 2 回の本試験を実施した (Table 2、3)。その結果、すべての検定菌において、2 回の試験とも溶媒対照値の 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。

DAEMAについて実施したすべての試験において、用いた試験の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験ではいずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、溶媒対照値とともに、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、本試験系の有効性が確認された。

【結 論】

以上の結果に基づき、2-(ジエチルアミノ)エチル=メタクリレートは、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。

【特 記 事 項】

試験の全過程を通して、試験の信頼性に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。

【文 献】

- 1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: in "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D.M., Ames, B.N.: Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 3) Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360

Table 1. Cytotoxicity of 2-(diethylamino) ethyl methacrylate on bacteria

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
S9 mix (-)	0	98	102	105	13	10	16	18	21	22	25	23	29	10	6	5	(102 ± 3.5)	(13 ± 3.0)	(20 ± 2.1)	(26 ± 3.1)	(7 ± 2.6)
	50.0	117			6			24			20			5							
	150	101			11			14			23			8							
	500	110			8			19			9			4							
	1500	98			7			19			22			2							
	5000	0 *			0 *			18			2 *			0 *							
S9 mix (+)	0	149	123	95	12	12	15	29	23	25	37	44	28	9	8	11	(122 ± 27.0)	(13 ± 1.7)	(26 ± 3.1)	(36 ± 8.0)	(9 ± 1.5)
	50.0	116			10			19			29			8							
	150	102			13			16			29			7							
	500	141			13			19			32			9							
	1500	117			14			21			30			7							
	5000 c	71 *			7 *			29 *			43 *			12 *							
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	465	466	441	296	322	317	91	91	86	508	532	569	1333	1252	1413	(457 ± 14.2)	(312 ± 13.8)	(89 ± 2.9)	(536 ± 30.7)	(1333 ± 80.5)
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2							
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	540	558	513	182	219	198	352	366	387	511	504	533	212	229	231	(537 ± 22.6)	(200 ± 18.6)	(368 ± 17.6)	(516 ± 15.1)	(224 ± 10.4)

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 99.8% and 470 ppm stabilizer (MEHQ), 0.03% water, 0.02% MMA and 0.11% alcohol were contained as impurities.

Table 2. Mutagenicity of 2-(diethylamino) ethyl methacrylate on bacteria (I)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	114	101	100	14	15	21	17	17	20	22	17	23	6	6	10	
		(105 ± 7.8)			(17 ± 3.8)			(18 ± 1.7)			(21 ± 3.2)			(7 ± 2.3)			
	156	93	86	101	11	15	17	ND			17	22	25	3	9	4	
		(93 ± 7.5)			(14 ± 3.1)						(21 ± 4.0)			(5 ± 3.2)			
	313	101	102	90	15	11	13	20	23	16	18	28	25	7	4	9	
		(98 ± 6.7)			(13 ± 2.0)			(20 ± 3.5)			(24 ± 5.1)			(7 ± 2.5)			
	625	101	104	113	17	16	22	20	13	18	29	26	27	7	7	7	
		(106 ± 6.2)			(18 ± 3.2)			(17 ± 3.6)			(27 ± 1.5)			(7 ± 0.0)			
1250	103	119	92	13	18	14	13	16	17	15	24	28	5	4	7		
	(105 ± 13.6)			(15 ± 2.6)			(15 ± 2.1)			(22 ± 6.7)			(5 ± 1.5)				
2500	89	119	102	6	22	14	17	18	20	30	19	19	9	9	7		
	(103 ± 15.0)			(14 ± 8.0)			(18 ± 1.5)			(23 ± 6.4)			(8 ± 1.2)				
5000 c	94 *	81 *	99 *	2 *	5 *	4 *	17	20	12	16 *	24 *	25 *	4 *	3 *	3 *		
	(91 ± 9.3)			(4 ± 1.5)			(16 ± 4.0)			(22 ± 4.9)			(3 ± 0.6)				
S9 mix (+)	0	123	124	134	17	8	13	13	23	30	29	36	36	6	13	10	
		(127 ± 6.1)			(13 ± 4.5)			(22 ± 8.5)			(34 ± 4.0)			(10 ± 3.5)			
	156	107	107	109	13	18	21	24	22	26	38	31	33	5	13	8	
		(108 ± 1.2)			(17 ± 4.0)			(24 ± 2.0)			(34 ± 3.6)			(9 ± 4.0)			
	313	121	109	106	13	26	27	22	18	24	34	33	30	10	7	6	
		(112 ± 7.9)			(22 ± 7.8)			(21 ± 3.1)			(32 ± 2.1)			(8 ± 2.1)			
	625	94	128	123	18	19	21	28	34	23	31	35	34	15	6	8	
		(115 ± 18.4)			(19 ± 1.5)			(28 ± 5.5)			(33 ± 2.1)			(10 ± 4.7)			
1250	105	122	148	23	21	17	30	28	32	34	30	30	8	6	12		
	(125 ± 21.7)			(20 ± 3.1)			(30 ± 2.0)			(31 ± 2.3)			(9 ± 3.1)				
2500 c	116 *	127 *	124	14 *	17 *	11 *	18 *	17	20	31 *	33 *	34 *	11 *	7 *	12 *		
	(122 ± 5.7)			(14 ± 3.0)			(18 ± 1.5)			(33 ± 1.5)			(10 ± 2.6)				
5000 c	36 *	123 *	140 *	18 *	8 *	13 *	22 *	17 *	31 *	37 *	35 *	36 *	8 *	17 *	13 *		
	(100 ± 55.8)			(13 ± 5.0)			(23 ± 7.1)			(36 ± 1.0)			(13 ± 4.5)				
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			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	501	539	554	367	379	353	86	85	89	618	632	592	1516	1966	2060	
		(531 ± 27.3)			(366 ± 13.0)			(87 ± 2.1)			(614 ± 20.3)			(1847 ± 290.8)			
	Number of colonies / plate	539	559	600	228	226	215	321	355	407	367	385	370	170	210	183	
		(566 ± 31.1)			(223 ± 7.0)			(361 ± 43.3)			(374 ± 9.6)			(188 ± 20.4)			

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 99.8% and 470 ppm stabilizer (MEHQ), 0.03% water, 0.02% MMA and 0.11% alcohol were contained as impurities.

ND : Not done

Table 3. Mutagenicity of 2-(diethylamino) ethyl methacrylate on bacteria (II)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
S9 mix (-)	0	107	107	99	12	10	11	16	19	16	25	23	22	8	8	6	(104 ± 4.6)	(11 ± 1.0)	(17 ± 1.7)	(23 ± 1.5)	(7 ± 1.2)
	156	115	106	121	16	8	13	ND			22	21	21	5	9	9	(114 ± 7.5)	(12 ± 4.0)		(21 ± 0.6)	(8 ± 2.3)
	313	109	89	100	17	15	16	16	21	21	27	21	33	7	8	6	(99 ± 10.0)	(16 ± 1.0)	(19 ± 2.9)	(27 ± 6.0)	(7 ± 1.0)
	625	102	92	102	14	10	12	23	20	24	29	23	27	9	5	8	(99 ± 5.8)	(12 ± 2.0)	(22 ± 2.1)	(26 ± 3.1)	(7 ± 2.1)
	1250	112	105	90	10	5	18	23	20	14	22	22	32	5	7	3	(102 ± 11.2)	(11 ± 6.6)	(19 ± 4.6)	(25 ± 5.8)	(5 ± 2.0)
	2500	102	101	108	12	15	11	18	23	20	29	34	26	7	10	10	(104 ± 3.8)	(13 ± 2.1)	(20 ± 2.5)	(30 ± 4.0)	(9 ± 1.7)
	5000 c	42 *	87 *	95 *	0 *	0 *	0 *	34	25	25	6 *	10 *	16 *	0 *	0 *	0 *	(75 ± 28.6)	(0 ± 0.0)	(28 ± 5.2)	(11 ± 5.0)	(0 ± 0.0)
S9 mix (+)	0	107	127	111	17	15	20	28	27	24	35	30	37	12	11	13	(115 ± 10.6)	(17 ± 2.5)	(26 ± 2.1)	(34 ± 3.6)	(12 ± 1.0)
	156	103	92	94	12	19	16	34	20	29	32	25	28	10	12	8	(96 ± 5.9)	(16 ± 3.5)	(28 ± 7.1)	(28 ± 3.5)	(10 ± 2.0)
	313	101	102	115	15	11	11	29	27	19	31	27	30	7	13	10	(106 ± 7.8)	(12 ± 2.3)	(25 ± 5.3)	(29 ± 2.1)	(10 ± 3.0)
	625	107	100	95	18	15	12	30	18	20	34	38	35	10	10	11	(101 ± 6.0)	(15 ± 3.0)	(23 ± 6.4)	(36 ± 2.1)	(10 ± 0.6)
	1250	127	101	118	21	16	17	27	21	19	31	33	29	15	7	10	(115 ± 13.2)	(18 ± 2.6)	(22 ± 4.2)	(31 ± 2.0)	(11 ± 4.0)
	2500 c	153	119	133	11 *	21 *	11 *	27 *	19 *	8 *	27 *	31 *	31 *	6 *	6 *	10 *	(135 ± 17.1)	(14 ± 5.8)	(18 ± 9.5)	(30 ± 2.3)	(7 ± 2.3)
	5000 c	114 *	138 *	142 *	15 *	15 *	13 *	21 *	21 *	25 *	33 *	49 *	45 *	15 *	19 *	18 *	(131 ± 15.1)	(14 ± 1.2)	(22 ± 2.3)	(42 ± 8.3)	(17 ± 2.1)
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	517	534	534	439	448	429	80	93	77	620	612	576	1726	1314	1091	(528 ± 9.8)	(439 ± 9.5)	(83 ± 8.5)	(603 ± 23.4)	(1377 ± 322.2)
	Number of colonies / plate	529	552	580	240	217	201	400	377	331	460	375	346	276	233	196	(554 ± 25.5)	(219 ± 19.6)	(369 ± 35.1)	(394 ± 59.2)	(235 ± 40.0)

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 99.8% and 470 ppm stabilizer (MEHQ), 0.03% water, 0.02% MMA and 0.11% alcohol were contained as impurities.

ND : Not done