



2,3-ジメチルアニリン
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	8
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1～3	

【要 約】

2,3-ジメチルアニリン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、陽性の結果を得た。

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、S9 mix 無添加試験および添加試験とともに5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1537 の S9 mix 無添加試験と TA100 の S9 mix 添加試験は1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上) で抗菌性が認められた。したがって、本試験は S9 mix 無添加試験および添加試験ともに、最高用量を5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1537 の S9 mix 無添加試験と TA100 の S9 mix 添加試験は2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) として、公比2で6用量を設定して実施した。

その結果、TA100 の S9 mix 添加試験において、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加が認められたことから、2,3-ジメチルアニリンは、用いた試験系において変異原性を有する(陽性)と判定された。

【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、2,3-ジメチルアニリンについて、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（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, 4)}を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）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、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。

〔被 験 物 質〕

2,3-ジメチルアニリン (略称: DMA、CAS No. 87-59-2) は、分子量 121.18 の淡褐色透明液体である。構造式等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は、ロット番号
純度 99.7 wt% (不純物: 微量の異性体、0.1%以下の水分) であり、
から供与された。被験物質は、使用時まで遮光して冷蔵した。なお、試験終了後にスガイ化学工業(株)において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 99.7 wt% であった。

DMAは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: ESK4546、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、同溶媒で公比約 3 ないし 2 で希釈し、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-アミリアクリン (Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641,	純度98%以上)
2AA	: 2-アミノアントラセン (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 (和光純薬工業(株)) 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)製の最少寒天培地 (ロット番号 : HY0302、1995年9月29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	バクアガー (Difco)	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 を流して固めてある。

3) S9 mix (1 ml中下記の成分を含む)

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

** : 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-333、1995年9月8日製造および RAA-338、同年12月15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、ラットの解剖および S9 の調製は5日目であった。

[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分間往復振とう培養したのち、トップアガー 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。各検定菌ごとの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、結果の再現性の確認を行った。また、陽性結果が得られた TA100 の S9 mix 添加試験については、本試験で変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上となった用量について、変異コロニー数の平均値から溶媒対照値を差し引いた値を、用量で除して比変異活性値(誘発復帰変異コロニー数/mg)を求めた。

〔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。ただし、2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が10以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

DMA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、S9 mix 無添加試験および添加試験とともに 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1537 の S9 mix 無添加試験と TA100 の S9 mix 添加試験は 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上) 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1537 の S9 mix 無添加試験と TA100 の S9 mix 添加試験は 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験とともに、上記の最高用量に基づいて公比2で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、TA100 の S9 mix 添加試験においては、2回の試験とともに、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた。TA100 の S9 mix 無添加試験と、その他の検定菌においては、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。

TA100の S9 mix 添加試験の本試験における比変異活性値をAppendix2 に示した。当被験物質の最大比変異活性値は 341.9 (本試験Ⅱ、313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) で、同一条件下における陽性対照物質 2-アミノアントラセンの値 (669000) の約2000分の1であった。

DMAについて実施したすべての試験において、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、溶媒対照群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、2,3-ジメチルアニリンは、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）と判定した。

【特 記 事 項】

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。

【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.: *Mutat. Res.* 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
- 4) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984) pp.161-187

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of 2,3-dimethylaniline on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /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	114	138	124	5	15	9	13	22	23	21	21	23	20	12	11	
		(125 \pm 12.1)			(10 \pm 5.0)			(19 \pm 5.5)			(22 \pm 1.2)			(14 \pm 4.9)			
	50.0	137			11			21			31			13			
	150	133			10			21			27			19			
	500	133			8			32			29			13			
	1500	151			12			23			20			8 *			
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
S9mix (+)	0	114	127	114	10	7	7	16	20	23	21	26	36	11	7	17	
		(118 \pm 7.5)			(8 \pm 1.7)			(20 \pm 3.5)			(28 \pm 7.6)			(12 \pm 5.0)			
	50.0	199			15			23			25			23			
	150	260			11			31			38			22			
	500	244			18			30			42			13			
	1500	240 *			9			29			41			5			
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
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			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	318	398	446	348	344	325	119	108	108	620	649	622	601	527	776	
		(387 \pm 64.7)			(339 \pm 12.3)			(112 \pm 6.4)			(630 \pm 16.2)			(635 \pm 127.9)			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	696	742	802	256	259	277	619	624	548	276	275	284	297	264	233	
		(747 \pm 53.2)			(264 \pm 11.4)			(597 \pm 42.5)			(278 \pm 4.9)			(265 \pm 32.0)			

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.

Purity was 99.7 wt% and a very small amount of isomer and below 0.1% water were contained as impurities.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 2,3-dimethylaniline 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							
S9mix (-)	0	93	93	106	9	10	7	26	15	19	20	18	20	8	2	7	(97 ± 7.5)	(9 ± 1.5)	(20 ± 5.6)	(19 ± 1.2)	(6 ± 3.2)
	78.1	ND			ND			ND			ND			8 8 7			(8 ± 0.6)				
	156	78	97	91	8	2	8	20	20	19	21	22	26	4	5	7	(89 ± 9.7)	(6 ± 3.5)	(20 ± 0.6)	(23 ± 2.6)	(5 ± 1.5)
	313	85	79	96	4	3	12	26	18	14	25	23	25	7	5	3	(87 ± 8.6)	(6 ± 4.9)	(19 ± 6.1)	(24 ± 1.2)	(5 ± 2.0)
	625	114	82	82	8	11	10	26	27	26	14	14	15	9	13	2	(93 ± 18.5)	(10 ± 1.5)	(26 ± 0.6)	(14 ± 0.6)	(8 ± 5.6)
	1250	108	85	102	9	16	8	19	22	16	23	21	22	7	11	5	(98 ± 11.9)	(11 ± 4.4)	(19 ± 3.0)	(22 ± 1.0)	(8 ± 3.1)
	2500	0 *	1 *	0 *	0 *	0 *	0 *	15	15	11	11 *	1 *	10 *	0 *	0 *	0 *	(0 ± 0.6)	(0 ± 0.0)	(14 ± 2.3)	(7 ± 5.5)	(0 ± 0.0)
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)
S9mix (+)	0	97	108	92	4	10	11	20	34	29	19	18	31	11	10	11	(99 ± 8.2)	(8 ± 3.8)	(28 ± 7.1)	(23 ± 7.2)	(11 ± 0.6)
	78.1	154	155	149	ND			ND			ND			ND			(153 ± 3.2)				
	156	183	170	169	10	12	12	30	25	16	25	28	29	13	18	16	(174 ± 7.8)	(11 ± 1.2)	(24 ± 7.1)	(27 ± 2.1)	(16 ± 2.5)
	313	206	187	196	15	14	17	22	22	25	24	28	20	12	12	13	(196 ± 9.5)	(15 ± 1.5)	(23 ± 1.7)	(24 ± 4.0)	(12 ± 0.6)
	625	217	205	217	12	4	20	26	18	14	31	34	33	19	19	22	(213 ± 6.9)	(12 ± 8.0)	(19 ± 6.1)	(33 ± 1.5)	(20 ± 1.7)
	1250	216 *	234 *	174 *	4	9	7	25	35	33	30	29	22	15	9	8	(208 ± 30.8)	(7 ± 2.5)	(31 ± 5.3)	(27 ± 4.4)	(11 ± 3.8)
	2500	215 *	185 *	147 *	9	12	11	24	25	22	38	31	30	11 *	7 *	11 *	(182 ± 34.1)	(11 ± 1.5)	(24 ± 1.5)	(33 ± 4.4)	(10 ± 2.3)
	5000				0 *	0 *	0 *	0 *	11 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)	(4 ± 6.4)	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)
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							
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	536	591	648	266	288	260	432	413	414	656	641	677	558	1059	1013	(592 ± 56.0)	(271 ± 14.7)	(420 ± 10.7)	(658 ± 18.1)	(877 ± 276.9)
	Number of colonies / plate	751	634	786	279	269	235	517	543	554	327	327	357	264	322	324	(724 ± 79.6)	(261 ± 23.1)	(538 ± 19.0)	(337 ± 17.3)	(303 ± 34.1)

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.

Purity was 99.7 wt% and a very small amount of isomer and below 0.1% water were contained as impurities.

ND : Not done

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 2,3-dimethylaniline 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							
S9mix (-)	0	92	105	93	6	4	8	39	23	17	17	18	14	9	7	7	(97 ± 7.2)	(6 ± 2.0)	(26 ± 11.4)	(16 ± 2.1)	(8 ± 1.2)
	78.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6	4	7	(6 ± 1.5)				
	156	80	107	81	3	9	8	21	25	13	24	14	17	4	5	3	(89 ± 15.3)	(7 ± 3.2)	(20 ± 6.1)	(18 ± 5.1)	(4 ± 1.0)
	313	112	117	102	9	7	12	33	22	17	40	31	15	6	6	7	(110 ± 7.6)	(9 ± 2.5)	(24 ± 8.2)	(29 ± 12.7)	(6 ± 0.6)
	625	97	99	107	8	9	2	25	27	24	21	19	30	10	14	8	(101 ± 5.3)	(6 ± 3.8)	(25 ± 1.5)	(23 ± 5.9)	(11 ± 3.1)
	1250	129	110	116	6	6	3	27	15	19	15	14	31	7 *	5 *	6 *	(118 ± 9.7)	(5 ± 1.7)	(20 ± 6.1)	(20 ± 9.5)	(6 ± 1.0)
	2500	67 *	93 *	99 *	5 *	2 *	3 *	12	12	12	11 *	10 *	10 *	0 *	5 *	0 *	(86 ± 17.0)	(3 ± 1.5)	(12 ± 0.0)	(10 ± 0.6)	(2 ± 2.9)
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)
S9mix (+)	0	102	106	99	9	8	6	30	20	34	17	35	32	10	6	13	(102 ± 3.5)	(8 ± 1.5)	(28 ± 7.2)	(28 ± 9.6)	(10 ± 3.5)
	78.1	143	190	173	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	(169 ± 23.8)				
	156	179	186	163	16	7	14	18	39	29	38	37	31	7	10	18	(176 ± 11.8)	(12 ± 4.7)	(29 ± 10.5)	(35 ± 3.8)	(12 ± 5.7)
	313	215	181	232	17	11	9	24	32	41	26	32	26	13	11	7	(209 ± 26.0)	(12 ± 4.2)	(32 ± 8.5)	(28 ± 3.5)	(10 ± 3.1)
	625	224	227	206	14	15	11	27	37	22	50	25	28	13	4	14	(219 ± 11.4)	(13 ± 2.1)	(29 ± 7.6)	(34 ± 13.7)	(10 ± 5.5)
	1250	188	213	199	7	18	12	17	27	19	49	38	34	8	10	8	(200 ± 12.5)	(12 ± 5.5)	(21 ± 5.3)	(40 ± 7.8)	(9 ± 1.2)
	2500	148 *	189 *	169 *	7	12	8	13	31	14	34	37	35	5 *	6 *	2 *	(169 ± 20.5)	(9 ± 2.6)	(19 ± 10.1)	(35 ± 1.5)	(4 ± 2.1)
	5000				0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)
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							
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	685	788	840	323	317	353	833	833	804	488	261	338	310	323	278	(771 ± 78.9)	(331 ± 19.3)	(823 ± 16.7)	(362 ± 115.4)	(304 ± 23.2)

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.

Purity was 99.7 wt% and a very small amount of isomer and below 0.1% water were contained as impurities.

ND : Not done