2,3-シメチルアニリン 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

財団法人食品繁品安全支アダー 秦 野 研 究 原

【目 次】

			貝
要	約		1
緒	言		2
材料およ	び方法		3
結果およ	び考察		7
結	論	w	8
特 記	事 項		8
文	献		8
Tables	1~3		

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 $Bscherichia\ coli\ WP2\ uvrA\ の5 菌株を用い、<math>S9\ mix\ 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験および 2 回の本試験を行った。用量設定試験を <math>50.0\sim5000\ \mu g/7\nu$ -トの用量で行ったところ、 $S9\ mix\ 無添加試験および添加試験でともに <math>5000\ \mu g/7\nu$ -ト($TA1537\ o$ $S9\ mix\ 無添加試験と\ TA100\ o$ $S9\ mix\ 添加試験は <math>1500\ \mu g/7\nu$ -ト以上)で抗菌性が認められた。したがって、本試験は $S9\ mix\ 無添加試験は <math>S9\ mix\ m$ 無添加試験 と $S9\ mix\ m$ $S9\ m$ S

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。 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日にを受けた。

から分与

検定菌は-80℃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、ニュートリエントブロス№ 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〕

2,3-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㈱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㈱) 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-(2-7リル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

(上野製薬㈱) 四小番号 46, 純度99.9%)

SA : アジイヒナトリウム 9AA : 9-アミノアクリジン

(和光純薬工業(株) ロット番号 TWR3330, (Sigma Chem. Co. ロット番号 96F05641,

純度90%以上)

 $2AA : 2-7 \in J7 \vee b \ni t \vee$

(Sigma Chem. Co.

(和光純薬工業㈱ ロット番号 DSF2950,

純度98%以上) 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℃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 $0.5 \, \mathrm{mM}$

*: 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㈱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1ℓあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マクネシウム・7水和物 0.2g水酸化ナトリウム $0.66\,\mathrm{g}$

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

リン酸ーアンモニウム

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**	$0.1 \mathit{ml}$	NADH	4	$\mu\mathrm{mol}$
塩化マクネシウム	$8 \mu mol$	NADPH	4	$\mu\mathrm{mol}$
塩化カリウム	$33 \mu \text{mol}$	ナトリウムーリン酸緩衝液	100	uma 1
グルコースー6-リン酸	$5 \mu \text{ mol}$	(pH 7.4)	100	μ mo i

** : 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℃で20分間往復振とう培養したのち、トップアガー2ml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℃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こととした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

DMAについて 50.0~5000 μ g/fν-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でともに 5000 μ g/fν-ト (TA1537 の S9 mix 無添加試験と TA100 の S9 mix 添加試験は 1500 μ g/fν-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 $5000 \mu\text{g}/7\nu$ -ト(TA1537 の S9 mix 無添加試験と TA100 の S9 mix 添加試験は $2500 \mu\text{g}/7\nu$ -ト)とした。

[本試験]

S9 mix 無添加試験および添加試験でともに、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回の試験でともに、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 μ g/ τ l/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	Test substance	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)					
without (-)	dose	В	ase - pair substitution		Frameshift type		
S9 mix	(μg /plate)		TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
	0	114 138 124 (125 ± 12.1)	5 15 9	13 22 23	21 21 23	20 12 11	
	50.0	137	11	21	31	13	
	150	133	10	21	27	19	
	500	133	8	32	29	13	·
S9mix	1500	151	12	23	20	8 *	·
(-)	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
	0	114 127 114 (118 ± 7.5)	10 7 7 (8± 1.7)	16 20 23 (20 ± 3.5)	21 26 36 (28 ± 7.6)	11 7 17 (12 ± 5.0)	
	50.0	199	15	23	25	23	
	150	260	11	31	38	22	
	500	244	18	30	42	13	
S9mix	1500	240 *	9	29	41	5	
(+)	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	·
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
control	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of	318 398 446	348 344 325	119 108 108	620 649 622	601 527 776	
Positiv-	Chamical	(387 ± 64.7)	(339 ± 12.3)		(630 ± 16.2) 2AA	(635 ± 127.9) 2AA	
Positive control	Chemical Dose (µg /plate)	2AA 1	2AA 2	2AA 10	0.5	2AA 2	
S9 mix (+)	Number of	696 742 802	256 259 277	619 624 548	276 275 284	297 264 233	
	colonies / plate	(747 ± 53.2)	(264 ± 11.4)		(278 ± 4.9)		

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

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

^{*:} Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 2,3-dimethylaniline on bacteria

With (+) or	Test substance	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)					
without (-)	dose	B	ase - pair substitution	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		Frameshift type	
S9 mix	(µg /plate)	TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
	0	93 93 106 (97 ± 7.5)	9 10 7	26 15 19	20 18 20	8 2 7	
	78.1	ND	ND	ND	ND	8 8 7 (8± 0.6)	
	156	78 97 91 (89 ± 9.7)	8 2 8 (6 ± 3.5)	20 20 19 (20 ± 0.6)	21 22 26 (23 ± 2.6)	4 5 7 (5± 1.5)	
	313	85 79 96 (87 ± 8.6)	4 3 12 (6± 4.9)	26 18 14 (19 ± 6.1)	 		
S9mix	625	114 82 82 (93 ± 18.5)	 	 	 	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
(-)	1250	108 85 102 (98 ± 11.9)	 			7 11 5 (8± 3.1)	
	2500	0 * 1 * 0 * (0 ± 0.6)	(0 ± 0.0)			0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
	5000	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	1	1 -			
	0	97 108 92 (99 ± 8.2)	4 10 11 (8 ± 3.8)	20 34 29 (28 ± 7.1)	19 18 31 (23 ± 7.2)	11 10 11 (11 ± 0.6)	
	78.1	154 155 149 (153 ± 3.2)		ND	ND	ND	
	156	183 170 169 (174 ± 7.8)	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			13 18 16 (16 ± 2.5)	
S9mix	625	$ \begin{array}{cccc} 206 & 187 & 196 \\ & (& 196 \pm & 9.5) \\ 217 & 205 & 217 \end{array} $	15 14 17 (15 ± 1.5) 12 4 20	$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	24 28 20 (24 ± 4.0) 31 34 33	12 12 13 (12 ± 0.6) 19 19 22	
(+)	1250	(213 ± 6.9) 216 * 234 * 174 *	(12 ± 8.0)	İ.		$ \begin{array}{c cccc} & 19 & 19 & 22 \\ & (& 20 \pm & 1.7) \\ \hline & 15 & 9 & 8 \\ \end{array} $	
	2500	(208 ± 30.8) 215 * 185 * 147 *	(7 ± 2.5)	1			<u> </u>
	5000	(182 ± 34.1)		(24 ± 1.5)	(33 ± 4.4)	(10 ± 2.3) 0 * 0 * 0 *	-
			(0± 0.0)	(4± 6.4)	(0± 0.0)	(0± 0.0)	
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
control	Dose (µg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	536 591 648 (592 ± 56.0)	266 288 260 (271 ± 14.7)	432 413 414 (420 ± 10.7)	656 641 677	558 1059 1013 (877 ± 276.9)	
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
control	Dose (µg/plate)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	751 634 786 (724 ± 79.6)	279 269 235 (261 ± 23.1)	517 543 554 (538 ± 19.0)	327 327 357 (337 ± 17.3)	264 322 324 (303 ± 34.1)	

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

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

ND: Not done

^{*:} Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 2,3-dimethylaniline on bacteria

With (+) or	Test substance	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)					
without (-)	dose	В.	ase - pair substitution			Frameshift type	
S9 mix	(μg /plate)	TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
	0	92 105 93	6 4 8	39 23 17	17 18 14	9 7 7	
	Ū				1		
	70.1	(97 ± 7.2)	 			(8± 1.2)	
	78.1	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				(4 ± 1.0)	
	313	112 117 102	9 7 12	33 22 17	40 31 15	6 6 7	
		(110 ± 7.6)	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	(24 ± 8.2)		(6± 0.6)	
S9mix	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	102 106 99	9 8 6	30 20 34	17 35 32	10 6 13	
	-	(102 ± 3.5)			ĺ	(10 ± 3.5)	
	78.1	143 190 173	ND	ND ND	ND	ND ND	· — · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	70.1	(169 ± 23.8)		1,2	1.2	.,2	i.
	156	179 186 163	16 7 14	18 39 29	38 37 31	7 10 18	
	150	(176 ± 11.8)	1	•	l	(12 ± 5.7)	
	313	215 181 232	17 11 9	24 32 41	26 32 26	13 11 7	
	313	(209 ± 26.0)			i		
S9mix	625		(12 ± 4.2) 14 15 11	(32 ± 8.5) 27 37 22	$ \begin{array}{c cccc} (&28 \pm & 3.5 \) \\ \hline 50 & 25 & 28 \\ \end{array} $	(10 ± 3.1) 13 4 14	
Symix	625		i		i		
1	4050	(219 ± 11.4)	 	 			
(+)	1250	188 213 199	ł .	17 27 19	Į.	8 10 8	
		(200 ± 12.5)				(9± 1.2)	
	2500	148 * 189 * 169 *		13 31 14	34 37 35	5 * 6 * 2 *	
		(169 ± 20.5)		1	i	(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)	·
	1						
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·					
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
control	Dose (µg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of	545 640 645	322 347 336	278 232 248	690 635 630	813 857 709	
	colonies / plate	(610 ± 56.3)	(335 ± 12.5)	(253 ± 23.4)	(652 ± 33.3)	(793 ± 76.0)	
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
control	Dose (µg /plate)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of	685 788 840	****	833 833 804	488 261 338	310 323 278	
	colonies / plate	(771 ± 78.9)					
AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide. SA: Sodium azide. 9AA: 9-Aminoacridine. 2AA: 2-Aminoanthracene							

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

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

ND: Not done

^{*:} Inhibition was observed against growth of the bacteria.