# 最終報告書

表 題:o-アミノビフェニルの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号: SR05367

株式会社 化合物安全性研究所

# 目 次

| 表紙      |  |
|---------|--|
| 目次      |  |
|         |  |
|         | 9  |
|         | *方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9  |
|         |  |
|         | 20   |
| 参考資料・   | 21   |
|         |  |
|         |  |
|         |  |
| Tables  |  |
| Table 1 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA100,   |
|         | TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvrA without metabolic activation |
|         | (dose-finding test) (SR05367)  |
| Table 2 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA100,   |
|         | TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvrA with metabolic activation    |
|         | (dose-finding test) (SR05367)  |
| Table 3 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA100,   |
|         | TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvrA without metabolic activation |
|         | (main test) (SR05367) · · · · · 25   |
| Table 4 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA100,   |
|         | TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvrA with metabolic activation    |
|         | (main test) (SR05367)  |

| Figures    |   |
|------------|---|
| Figure 1-1 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA100     |
|            | without metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)····· 27           |
| Figure 1-2 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA100     |
|            | with metabolic activation (dose-response curves) (SR05367) · · · · · 28         |
| Figure 2-1 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA1535    |
|            | without metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)····· 29           |
| Figure 2-2 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA1535    |
|            | with metabolic activation (dose-response curves) (SR05367) · · · · · · · 30     |
| Figure 3-1 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Escherichia coli WP2uvrA without |
|            | metabolic activation (dose-response curves) (SR05367) · · · · · · 31            |
| Figure 3-2 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Escherichia coli WP2uvrA with    |
|            | metabolic activation (dose-response curves) (SR05367) · · · · · · 32            |
| Figure 4-1 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA98      |
|            | without metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)····· 33           |
| Figure 4-2 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA98 with |
|            | metabolic activation (dose-response curves) (SR05367) · · · · · · · 34          |
| Figure 5-1 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA1537    |
|            | without metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)····· 35           |
| Figure 5-2 | Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA1537    |
|            | with metabolic activation (dose-response curves) (SR05367) · · · · · · · 36     |

### 要約

o-アミノビフェニルの細菌における遺伝子突然変異誘発性を検討する目的で、 Salmonella typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 および Escherichia coli WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験を実施した。試験は代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法) ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法で実施した。

用量設定試験 (5~5000  $\mu$ g/plate) の結果、S. typhimurium TA98 の代謝活性化法の 150 および 500  $\mu$ g/plate の用量ならびに S. typhimurium TA100 の代謝活性化法の 50、150 および 500  $\mu$ g/plate の用量で、復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍以上となり、また、用量の増加に伴う復帰変異コロニー数の増加が認められた。その他の試験系列および菌株では、復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。生育阻害が、各菌株の各系列の 500  $\mu$ g/plate 以上の用量で観察された。また、被験物質の析出が、各菌株の各系列の 5000  $\mu$ g/plate の用量で観察された。

本試験  $(7.81\sim500~\mu g/plate)$  の結果、S.~typhimurium~TA98 の代謝活性化法の 125、250 および  $500~\mu g/plate$  の用量および S.~typhimurium~TA100 の代謝活性化法の 62.5、125、 250 および  $500~\mu g/plate$  の用量で、復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍以上となり、また、用量の増加に伴う復帰変異コロニー数の増加が認められた。その他の試験系列および菌株では、復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。生育阻害が、各菌株の各系列の  $500~\mu g/plate$  の用量で観察された。被験物質の析出は、いずれの菌株にも観察されなかった。このように、本試験において用量設定試験の再現性が確認された。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、それぞれにおける陰性対照群の値の2倍以上の明確な増加を示した。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、o-アミノビフェニルは、当該試験条件において、代謝活性化系の存在下で S. typhimurium TA98 および TA100 に対する遺伝子突然変異誘発性を有すると判断した。

## 緒 言

o-アミノビフェニルの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、Salmonella typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 および Escherichia coli WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法で実施した。

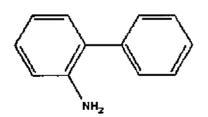
# 材料および方法

#### 1. 被験物質

名称 : o-アミノビフェニル 英名 : Biphenyl-2-ylamine

CAS No. : 90-41-5 化審法官報公示整理番号: (9)-81

構造式:



分子式: C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N分子量: 169. 23

物理化学的性質 : 外観 ; 薄茶褐色の結晶(beige crystals)

融点 ;49~49.8℃

沸点 ; 299℃

蒸気圧; 0.000117 mmHg(25℃)

溶解性;水に僅かに溶解(233 mg/L)

純度 : 99.4% (Appendix 1)

不純物の名称およびその濃度:不明

入手量:5 g (関連試験と共通)

安定性:実験終了後に、残余被験物質について純度分析を東京化成工業

株式会社に依頼し、報告書(Appendix 2)を人手した。その結果、

被験物質は実験期間中安定であったことが確認された。

保存場所 : 検体保存室および変異原性試験室

保存条件 : 密閉、冷所(実測範囲;2~8℃)、遮光

保存期間 : 2006 年 6 月 21 日(受入)~2006 年 8 月 22 日(最終使用日)

取扱上の注意:ゴム手袋およびマスクを着用し、クリーンベンチ内で取扱った。

粉塵等を吸入しないよう注意し、皮膚との接触を避け、また、

着衣等に付着しないように注意した。

残余被験物質の処置 :試験操作終了後、残余被験物質全てを純度分析のため分析依頼

先へ送付した。

#### 2. 被験物質の調製

被験物質は水に難溶性であるため、ジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式 会社同仁化学研究所)を用いて溶解ならびに希釈し調製した。

用量設定試験では、50 mg/mL 調製液を調製し、50 mg/mL 調製液から公比約3で段階 希釈し15、5、1.5、0.5、0.15 および0.05 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では、5 mg/mL 調製液を調製し、5 mg/mL 調製液から公比 2 で段階希釈し 2.5、1.25、0.625、0.313、0.156 および 0.0781 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、用量設定試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体の反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は、用量設定試験では調製後 2.4 時間以内に、本試験では調製後 2.3 時間以内に使用した。

調製液はクリーンベンチ内で用時に調製し、調製に際してはマスクおよび手袋を着用し、吸引したり皮膚に触れないようにして取扱った。残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

#### 3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体であるジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所)を、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。

#### 4. 陽性対照物質およびその調製

陽性対照物質として、次表の既知変異原物質を使用した。これらの陽性対照物質は、 遮光および冷所(2~8℃設定)で保存した。

陽性対照物質は、含量補正をせずにそれぞれ次表の濃度に調製し、分注後-20℃以下で凍結保存したものを解凍後 2.1 時間以内に使用した。調製液は、調製日より 6 ヵ月以内(使用期限:調製後1年)に使用した。

| 陽性対照物質   | 調製濃度                     | 調製媒体                                      |
|--|--------------------------|---|
| 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)<br>アクリルアミド(含量 100.2%)<br>ロット番号 WAP0369<br>和光純薬工業株式会社     | 0.1および<br>1 μg/mL        | ジメチルスルホキシド<br>ロット番号 SL.045<br>株式会社同仁化学研究所 |
| アジ化ナトリウム(純度 99.8%)<br>ロット番号 SDH6348<br>和光純薬工業株式会社                                  | 5 μg/mL                  | 日本薬局方注射用水<br>ロット番号 5D73<br>株式会社大塚製薬工場     |
| 9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物<br>(含量 98.8%)<br>ロット番号 03024JR<br>Aldrich Chemical Company, Inc. | 800 μg/mL                | ジメチルスルホキシド<br>ロット番号 SL045<br>株式会社同仁化学研究所  |
| 2-アミノアントラセン<br>(含量 97.4%)<br>ロット番号 TCG4316<br>和光純薬工業株式会社                           | 5、10、20 およ<br>び100 μg/mL | ジメチルスルホキシド<br>ロット番号 SL045<br>株式会社同仁化学研究所  |

#### 5. 試験菌株

試験には、Salmonella typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 ならびに Escherichia coli WP2uvrA を使用した。これらの菌株は、1991年10月18日に国立衛生試験所(現 国

立医薬品食品衛生研究所)より分与された。また、これらの菌株は遺伝毒性を有する化 学物質の検索に適した細菌として広く受け入れられていることから選択した。

各菌株は、培養液 8 mL に対しジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所) 0.7 mL を加え、試験チューブに分注後-80℃以下で凍結保存した。各菌株の培養液の一部を用いて、菌株の特性(アミノ酸要求性、膜変異 rfa 特性、紫外線感受性および薬剤耐性) ならびに陰性対照物質および陽性対照物質に対する感受性の検査を行い、これらの特性が正常に保持されていることが確認された菌株を試験に使用した。

#### 6. 培地

#### (1) 前培養用培地

前培養用のニュートリエントブロス培地として、ニュートリエントブロス (OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号 298714、OXOID LTD.)を日本薬局方注射用水 (ロット番号 5L88、株式会社大塚製薬工場)を用いて 25 g/L に調製した。S. typhimurium TA98 および TA100 の培地には、使用時にアンピシリンナトリウム (ロット番号 M3F9025、ナカライテスク株式会社)を 25  $\mu$ g/ml. となるように添加した。

#### (2) 試験用培地(最少グルコース寒天培地)

試験用培地として使用した最少グルコース寒天培地(バイタルメディア AMT-0 培地、ロット番号 DZL74E01、2006 年 4 月 14 日製造、極東製薬工業株式会社)1000 mL 中の組成は次表の通りである。

| 試験用培地 1000 mL 中の組成                  |         |
|-------------------------------------|---------|
| 硫酸マグネシウム・7水塩                        | 0.2 g   |
| クエン酸・1 水塩                           | 2.0 g   |
| リン酸二カリウム・無水塩                        | 10.0 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  |
| ブドウ糖                                | 20.0 g  |
| 寒天末(OXOID AGAR No.1、ロット番号 819273-2) | 15. 0 g |

#### (3) 重層用培地

次頁の表の組成のソフトアガーおよびアミノ酸溶液を蒸留水を用いて調製し、使用時に(A):(B)=10:1の容量比で混合した。S. typhimuriumには L-ヒスチジンおよび D-ビオチンのアミノ酸溶液を、E. coliには L-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。

| 重層用培地の組成                                     |    |             |
|--|----|-------------|
| (A) ソフトアガー                                   |    |             |
| Bacto <sup>™</sup> Agar                      |    | 0.6 %       |
| (ロット番号 5123150、Becton,Dickinson and Company) |    |             |
| 塩化ナトリウム                                      |    | 0.5 %       |
| (ロット番号 611F1714、関東化学株式会社)                    |    |             |
| (B) アミノ酸溶液                                   |    |             |
| L-ヒスチジンおよび D-ビオチン溶液                          | 各々 | 0.5  mmol/L |
| (L-ヒスチジン、ロット番号 DWN1024、和光純薬工業株式会社)           |    |             |
| (D-ビオチン、ロット番号 ASM1069、和光純薬工業株式会社)            |    |             |
| または  |    |             |
| L-トリプトファン溶液                                  |    | 0.5  mmol/L |
| (L-トリプトファン、ロット番号 ASG2385、和光純薬工業株式会社)         |    |             |

#### 7. S9 mix

S9 mix は、S9(ロット番号 RAA-541、2006 年 4 月 7 日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor (Cofactor-I、ロット番号 999601、オリエンタル酵母工業株式会社) および日本薬局方注射用水(ロット番号 5L88、株式会社大塚製薬工場)を用いて用時調製した。

S9 は、購入後-80℃以下で保存し、製造日より 5 ヵ月以内(使用期限:製造後 6 ヵ月)に使用した。この S9 は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した S1c:SD 系ラット(雄)の肝ホモジネートより調製された。

S9 mix 1 mL 中の組成は次表の通りである。

| S9 mix 1 mL中の組成                 |      |                 |
|---------------------------------|------|-----------------|
| S9                              | 0. 1 | . mL            |
| 塩化マグネシウム                        | 8    | $\mu\text{mol}$ |
| 塩化カリウム                          | 33   | $\mu\text{mol}$ |
| グルコースー6ーリン酸                     | 5    | $\mu$ mol       |
| 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH) | 4    | $\mu$ mo $1$    |
| 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)     | 4    | $\mu$ mo $1$    |
| リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4              | 100  | $\mu\text{mo}1$ |

#### 8. 試験群

#### (1) 用量設定試験

各菌株につき代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)および存在下(代謝活性化 法)で試験を実施した。 直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000  $\mu$ g/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 用量の試験群 (5000、1500、500、150、50、15 および 5  $\mu$ g/plate)を設定した。

#### (2) 本試験

各菌株につき直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

用量設定試験において、各菌株の各系列ともに 500  $\mu$ g/plate 以上の用量で生育阻害が認められたことから、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を500  $\mu$ g/plate とし、以下公比 2 で用量を低下させた計 7 試験群 (500、250、125、62.5、31.3、15.6 および 7.81  $\mu$ g/plate)を設定した。

#### (3) 陰性対照群および陽性対照群

用量設定試験および本試験いずれにおいても、試験系列毎に陰性対照群(ジメチルスルホキシド)および次表の陽性対照群を設定した。

| 供試菌株                  |                  | 陽性対照物質(用量:μg/plate) |      |       |  |  |
|-----------------------|------------------|---------------------|------|-------|--|--|
|                       | 直                | 接法                  | 代謝活  | 性化法   |  |  |
| S. typhimurium TA100  | AF-2             | (0.01)              | 2-AA | (1)   |  |  |
| S. typhimurium TA1535 | NaN <sub>3</sub> | (0, 5)              | 2-AA | (2)   |  |  |
| E. coli WP2uvrA       | AF-2             | (0, 01)             | 2-AA | (10)  |  |  |
| S. typhimurium TA98   | AF-2             | (0, 1)              | 2-AA | (0.5) |  |  |
| S. typhimurium TA1537 | 9-AA             | (80)                | 2-AA | (2)   |  |  |

AF-2:2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>:アジ化ナトリウム、 9-AA:9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物

2-AA: 2-アミノアントラセン

#### (4) プレート数およびプレートの識別

プレート数は、各試験群ともに3枚とした。

プレートには、識別のための試験番号および試験群を記載したラベルを貼付した。

#### 9. 試験方法

#### (1) 試験菌株の前培養

容量約 40 mL の L 字管に前培養用培地 (ニュートリエントブロス培地) 12 mL を入れ、解凍した保存菌を 12 μL 接種し、37℃、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽 (Personal-11・EX、タイテック株式会社) で 10 時間の往復振盪培養を行った。なお、菌株の接種後、L 字管は振盪培養開始まで冷却(氷冷) した。培養終了時に、得られた菌培養液の 0D660nm を比色計 (mini photo 518、タイテック株式会社) で測定し、

各菌株の生菌数-0D660nm 相関式より生菌数を算出した。生菌数が 1×10° cel1s/mL より多く、十分に菌が生育していることが確認された菌培養液を試験に使用した。

各培養液の生菌数(計算値)は次表の通りであった。

|                       | 生菌数(計算値)(×10 <sup>9</sup> cells/mL) |       |  |  |  |
|-----------------------|-------------------------------------|-------|--|--|--|
| 供試菌株                  | 用量設定試験                              | 本試験   |  |  |  |
| S. typhimurium TA100  | 2. 92                               | 2. 78 |  |  |  |
| S. typhimurium TA1535 | 3. 56                               | 3. 41 |  |  |  |
| S. typhimurium TA98   | 2.84                                | 2. 72 |  |  |  |
| S. typhimurium TA1537 | 1.78                                | 1.78  |  |  |  |
| E. coli WP2uvrA       | 4. 32                               | 4. 14 |  |  |  |

#### (2) 被験物質および対照物質調製液の処理

被験物質および対照物質調製液の処理を、プレインキュベーション法で行った。

蓋付きのポリエチレン製チューブ(5 mL 容量)を使用して、被験物質あるいは対照物質調製液 0.1 mL を、直接法の場合は 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH7.4) 0.5 mL と、代謝活性化法の場合は S9 mix 0.5 mL と、それぞれ混合した。その混合液に菌培養液 0.1 mL を加え、37  $\mathbb{C}$  、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽 (Personal- $11 \cdot EX$ 、タイテック株式会社)で 20 分間振盪培養(プレインキュベーション)した。プレインキュベーション終了後、S. typhimurium には 0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび 0.05 mmol/L D-ビオチンを含む重層用培地 2 mL を、E. coli には 0.05 mmol/L L-トリプトファンを含む重層用培地 2 mL を、E. coli には 0.05 mmol/L L-トリプトファンを含む重層用培地 2 mL を、それぞれ加えて混和し、最少グルコース寒天培地(プレート)に重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、プレートを 37  $\mathbb{C}$  で 48  $\sim$  49 時間静置培養した (MIR-262 : 三洋電機株式会社)。

用量設定試験および本試験それぞれにおいて、試験に使用した被験物質調製液の最高濃度および S9 mix 調製液について雑菌の混入の有無を確認した。

#### (3) 観察

各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群について、プレートでの生育阻害の有無を実体顕微鏡(SZ6045TR、オリンパス光学工業株式会社)で確認するとともに、被験物質処理群について、プレートでの被験物質の析出の有無を目視確認した。次に、各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、コロニーアナライザー(CA-11D、システムサイエンス株式会社)を用いて復帰変異コロニー数の計測を行った。なお、生育阻害がコロニーアナライザー計数に影響すると

考えられるプレートについては、実体顕微鏡を用いて復帰変異コロニー数の計測を行った。

菌株の生育阻害の有無の判定は標準操作手順書に基づき以下の基準(0~4)で行い、 基準1以上を生育阻害有りとした。

0:生育阻害が認められない。

微細なバックグラウンドコロニー(50 倍程度の倍率で観察可能)が培地 一面に観察され、陰性対照群のバックグラウンドコロニーとの差が認められない場合。

1:わずかな生育阻害が認められる。

陰性対照群に比べ、バックグラウンドコロニーが減少して個々のコロニーの大きさが大きくなっている場合。

2:中程度の生育阻害が認められる。

隆起した大きな復帰変異コロニーと、平坦で小さなバックグラウンドコロニーが並存している場合。

3:強い生育阻害が認められる。

バックグラウンドコロニーが復帰変異コロニーと同程度の大きさまで成長し、両者の判別が困難である場合。

4: 生存菌が全く認められない。

(4) 観察結果の集計方法

各試験群の復帰変異コロニー数の平均値±標準偏差を求めた。

#### 10. 試験結果の評価

(1) 試験系の感度確認

各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が、それぞれ試験施設の背景 データに基づく管理値の範囲内であり、かつ、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の 2 倍以上である場合に、試験系が適切な感度を 有しているものと判断した。

(2) 試験結果の判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の 2 倍以上となり、かつ用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が、再現性を持って認められた場合に陽性であるとした。試験結果の判定にあたって、統計学的手法は用いなかった。

#### (3) 変異原比活性の算出

陽性結果となった S. typhimurium TA98 および TA100 の代謝活性化法について、以下の式により変異原比活性を算出した。いずれも算出値が最高となる用量の比活性を採用した。

比活性(Revertants/mg) = (A-B)/C

A: 当該用量における復帰変異コロニー数の平均値

B:陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値

C: 当該用量(mg/plate)

### 成績

用量設定試験の復帰変異コロニー数の計測結果を Table 1 および 2 に、本試験の復帰変異コロニー数の計測結果を Table 3 および 4 にそれぞれ示す。また、用量設定試験および本試験における被験物質用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を Figure 1-1~5-2 に示す。

用量設定試験 (5~5000  $\mu$ g/plate) の結果、S. typhimurium TA98 の代謝活性化法の 150 および 500  $\mu$ g/plate の用量ならびに S. typhimurium TA100 の代謝活性化法の 50、150 および 500  $\mu$ g/plate の用量で、復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍以上となった。また、いずれにおいても用量の増加に伴う復帰変異コロニー数の増加が認められた。変異原比活性は、S. typhimurium TA98 が 293 revertants/mg および S. typhimurium TA100 が 3580 revertants/mg であった。その他の試験系列および菌株では、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満で、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。生育阻害が、各菌株の各系列の 5000  $\mu$ g/plate以上の用量で観察された。被験物質の析出が、各菌株の各系列の 5000  $\mu$ g/plate の用量で観察された。

本試験 $(7.81\sim500~\mu g/plate)$ の結果、S.~typhimurium~TA98の代謝活性化法の125、250 および $500~\mu g/plate$ の用量およびS.~typhimurium~TA100の代謝活性化法の62.5、125、250 および $500~\mu g/plate$ の用量で、復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の2 倍以上となった。また、いずれにおいても用量の増加に伴う復帰変異コロニー数の増加が認められた。変異原比活性は、S.~typhimurium~TA98が344 revertants/mg およびS.~typhimurium~TA100が2896 revertants/mg であった。その他の試験系列および菌株では、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の2 倍未満で、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。生育阻害が、各菌株の各系列の $500~\mu g/plate$ の用量で観察された。被験物質の析出は、いずれの菌株にも観察されなかった。

用量設定試験および本試験いずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値(Appendix 3)の範囲内であり、

また、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て陰性対照群の値の2倍以上であった。

用量設定試験および本試験いずれの無菌試験においても、被験物質調製液の最高濃度および S9 mix に雑菌の混入はみられなかった。

## 考察

o-アミノビフェニルの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、S. typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 および E. coli WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。

用量設定試験は、被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 用量の試験群で実施した。本試験は、用量設定試験の結果に基づき被験物質の最高用量を 500 μg/plate とし、以下公比 2 で用量を低下させた計 7 用量の試験群で実施した。

試験の結果、用量設定試験および本試験ともに、S. typhimurium TA98 および TA100 の代謝活性化法では、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍以上となり、また、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が認められた。従って、当該被験物質は、フレームシフト型の変異原物質に感受性のある S. typhimurium TA98 および塩基対置換型の変異原物質に感受性のある S. typhimurium TA100 に対して、代謝活性化系の存在下で遺伝子突然変異誘発性を有すると判断した。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、それぞれにおける陰性対照群の値の2倍以上の明確な増加を示した。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、o-アミノビフェニルは、当該試験条件において、代謝活性化系の存在下で S. typhimurium TA98 および TA100 に対する遺伝子突然変異誘発性を有すると判断した。

なお、o-アミノビフェニル(2-ビフェニルアミン)の変異原性では、安全衛生情報センター情報 <sup>1)</sup> として、「体細胞  $in\ vivo$  遺伝毒性試験の SCE 試験で陰性だが(HSDB, 2004)、 $in\ vitro$  変異原性試験の Ames 試験(NTP DB (Access on Nov. 2008))ならびに染色体異常試験では陽性であった(RTECS (2006))。なお、 $in\ vitro$  染色体異常試験の陽性は、細胞毒性に起因したものと推察されている(Environ Mol Mutagen., 43, 36-44, 2004)。」との報告が

ある。また、類縁物質の変異原性では、4-ビフェニルアミンについて、NTP 概要資料 <sup>2,3)</sup> において Salmonella typhimuriumを用いた複数の復帰突然変異試験で陽性、in vitro 染色体異常試験および姉妹染色分体交換試験で陽性、マウスを用いた小核試験で陽性と報告されている。塩酸 2-ビフェニルアミンでは、復帰突然変異試験で陽性、染色体異常試験では陰性と陽性の結果、姉妹染色分体交換試験で陰性、マウスリンパ腫突然変異試験で陽性、マウス小核試験で陰性と報告されている <sup>4)</sup>。

当該復帰突然変異試験では、被験物質は代謝活性化系の存在下で陽性となり、他施設から報告されている陽性との試験結果と一致するものであった。他方、当試験施設で実施した染色体異常試験(試験番号: SR05368)では陰性結果が得られており、他試験施設から報告されている陽性結果とは異なるものであった。しかし、他試験施設における染色体異常試験の陽性結果は細胞毒性に起因したものとの解説がなされており、そうであるなら評価用量の細胞毒性の程度により染色体の構造異常の出現率が異なることが考えられる。また、細胞増殖率の測定方法の差により細胞毒性の評価に差が生ずることも考えられる。当試験施設の染色体異常試験では、各試験系列の評価最高用量の細胞増殖率は50%を軽度下回る程度のもので極度に強い細胞毒性ではなかったこと、評価最高用量では短時間処理法の2試験系列において、5%までは達しないまでも染色体の構造異常の出現率が増加傾向にあったことから、試験結果は他試験施設の結果と基本的に異なるものではないと考えられた。

# 参考資料

- 1) インターネットホームページ情報、安全衛生情報センター: 化学物質: 2-フェニルアニリン、製品安全データシート
- 2) ChemIDPlus/HSDB 90-41-5 Toxicity National Toxicology Program
- 3) Testing Status: 4-Biphenylamine 10445-G National Toxicology Program
- 4) Testing Status: 2-Biphenylamine hydrochloride 11205-A National Toxicology Program

Table 1 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvr* A without metabolic activation (dose-finding test) (SR05367)

| Compound             | Concentration            | Revertants per plate (Mean±S.D.)  S9 (-) |                             |                               |                             |                           |  |  |
|----------------------|--------------------------|--|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--|--|
|                      | (µg/plate)               | TA100                                    | TA1535                      | WP2uvr A                      | TA98                        | TA1537                    |  |  |
| Control <sup>a</sup> |                          | 110 , 138<br>127<br>(125±14)             | 8 , 11<br>6 (8±3)           | 13 , 14<br>22<br>(16±5)       | 25 , 13<br>21<br>(20±6)     | 8 , 8<br>6<br>(7±1)       |  |  |
| Biphenyl-2-ylamine   | 5                        | 142 , 132<br>124<br>(133±9)              | 7 , 2<br>7 (5±3)            | 8 , 16<br>22<br>(15±7)        | 23 , 26<br>13<br>(21±7)     | 6 , 8<br>9 (8±2)          |  |  |
|                      | 15                       | 132 , 127<br>154<br>(138±14)             | 6 , 8<br>6 (7±1)            | 16 , 11<br>12<br>(13±3)       | 28 , 22<br>26<br>(25±3)     | 5 , 5<br>6 (5±1)          |  |  |
|                      | 50                       | 137 , 147<br>123<br>(136±12)             | 10 , 12<br>3 (8±5)          | 17 , 18<br>15<br>(17±2)       | 27 , 27<br>17<br>(24±6)     | 10 , 4<br>8<br>(7±3)      |  |  |
|                      | 150                      | 115 , 126<br>126<br>(122±6)              | 7 , 11<br>6 (8±3)           | 24 , 20<br>16<br>(20±4)       | 21 , 26<br>23<br>(23±3)     | 9 , 6<br>7<br>(7±2)       |  |  |
|                      | 500                      | 89 * , 84 * 72 * (82±9)                  | 4 * , 5 *<br>4 *<br>(4±1)   | 13 * , 15 *<br>12 *<br>(13±2) | 11 * , 6 * 7 * (8±3)        | 5 * , 5 * 7 * (6±1)       |  |  |
|                      | 1500                     | 10 * , 17 *<br>21 *<br>(16±6)            | 0 * , 0 *<br>0 *<br>(0±0)   | 5 * , 9 *<br>3 *<br>(6±3)     | 0 * , 0 *<br>1 *<br>(0±1)   | 0 * , 0 *<br>0 *<br>(0±0) |  |  |
|                      | 5000                     | 0 **, 0 **<br>0 **<br>(0±0)              | 0 **, 0 **<br>0 **<br>(0±0) | 7 **, 2 **<br>1 **<br>(3±3)   | 0 **, 0 **<br>0 **<br>(0±0) | 0 #*,<br>0 #*<br>(0±0)    |  |  |
|                      |                          | AF-2                                     | NaN <sub>3</sub>            | AF-2                          | AF-2                        | 9-AA                      |  |  |
| Positive control     | Concentration (µg/plate) | 0.01                                     | 0.5                         | 0.01                          | 0.1                         | 80                        |  |  |
|                      | Rev./plate               |  | 322 , 351<br>321            | 95 , 130<br>99                | 461 , 442<br>469            | 324 , 204<br>157          |  |  |
|                      | (Mean±S.D.)              | (938±24)                                 | (331±17)                    | (108±19)                      | (457±14)                    | (228±86)                  |  |  |

a: Dimethyl sulfoxide

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev.: Revertants

#: Precipitation at the end of treatment

Table 2 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (dose-finding test) (SR05367)

| Compound             | Concentration (µg/plate) | Revertants per plate (Mean±S.D.)  S9 (+) |                              |                               |                               |                             |  |  |
|----------------------|--------------------------|--|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--|--|
|                      |                          | TA100                                    | TA1535                       | WP2uvr A                      | TA98                          | TA1537                      |  |  |
| Control <sup>a</sup> |                          | 126 , 124<br>114<br>(121±6)              | 10 , 7<br>10 (9±2)           | 16 , 13<br>24<br>(18±6)       | 30 , 27<br>29<br>(29±2)       | 13 , 7<br>14<br>(11±4)      |  |  |
| Biphenyl-2-ylamine   | 5                        | 184 , 171<br>184<br>(180±8)              | 14 , 12<br>6<br>(11±4)       | 15 , 15<br>21<br>(17±3)       | 38 , 37<br>27<br>(34±6)       | 8 , 8<br>11<br>(9±2)        |  |  |
|                      | 15                       | 220 , 211<br>206<br>(212±7)              | 9 , 7<br>11<br>(9±2)         | 16 , 25<br>22<br>(21±5)       | 55 , 33<br>34<br>(41±12)      | 9 , 6<br>8<br>(8±2)         |  |  |
|                      | 50                       | 297 , 321<br>283<br>(300±19)             | 12 , 13<br>14<br>(13±1)      | 17 , 16<br>26<br>(20±6)       | 46 , 43<br>62<br>(50±10)      | 13 , 11<br>4<br>(9±5)       |  |  |
|                      | 150                      | 318 , 319<br>402<br>(346±48)             | 16 , 10<br>16 (14±3)         | 18 , 13<br>20<br>(17±4)       | 77 , 82<br>59<br>(73±12)      | 11 , 6<br>6<br>(8±3)        |  |  |
|                      | 500                      | 327 * , 297 * 330 * (318±18)             | 13 * , 7 *<br>11 *<br>(10±3) | 12 * , 12 *<br>10 *<br>(11±1) | 62 * , 70 *<br>64 *<br>(65±4) | 5 * , 6 *<br>7 *<br>(6±1)   |  |  |
|                      | 1500                     | 0 * , 0 *<br>0 *<br>(0±0)                | 0 * , 0 *<br>0 *<br>(0±0)    | 7 * , 5 * 3 * (5±2)           | 0 * , 0 *<br>0 *<br>(0±0)     | 0 * , 0 *<br>0 *<br>(0±0)   |  |  |
|                      | 5000                     | 0 **, 0 **<br>0 **<br>(0±0)              | 0 **, 0 **<br>0 **<br>(0±0)  | 0 #*, 0 #*<br>0 #*<br>(0±0)   | 0 **, 0 **<br>0 **<br>(0±0)   | 0 #*, 0 #*<br>0 #*<br>(0±0) |  |  |
|                      |                          | 2-AA                                     | 2-AA                         | 2-AA                          | 2-AA                          | 2-AA                        |  |  |
| Positive control     | Concentration (µg/plate) | 1  | 2                            | 10                            | 0.5                           | 2                           |  |  |
|                      | Rev./plate               | 1065 , 974<br>1027                       | 314 , 253<br>327             | 820 , 824<br>771              | 215 , 229<br>195              | 125 , 175<br>162            |  |  |
|                      | (Mean±S.D.)              | (1022±46)                                | (298±40)                     | (805±30)                      | (213±17)                      | (154±26)                    |  |  |

a: Dimethyl sulfoxide

Rev.: Revertants

<sup>2-</sup>AA: 2-Aminoanthracene

<sup>#:</sup> Precipitation at the end of treatment

<sup>\*</sup>: Growth inhibition

Table 3 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (main test) (SR05367)

| Compound             | Concentration (µg/plate) | Revertants per plate (Mean±S.D.)  S9 (-) |                           |                         |                           |                      |  |
|----------------------|--------------------------|--|---------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------|--|
|                      | (µg/piute)               | TA100                                    | TA1535                    | WP2uvr A                | TA98                      | TA1537               |  |
| Control <sup>a</sup> |                          | 144 , 133<br>134<br>(137±6)              | 5 , 4<br>8<br>(6±2)       | 20 , 11<br>14<br>(15±5) | 15 , 17<br>8<br>(13±5)    | 6 , 6<br>13<br>(8±4) |  |
| Biphenyl-2-ylamine   | 7.81                     | 132 , 148<br>138<br>(139±8)              | 4 , 6<br>9<br>(6±3)       | 19 , 15<br>17<br>(17±2) | 11 , 14<br>12<br>(12±2)   | 9 , 11<br>6 (9±3)    |  |
|                      | 15.6                     | 124 , 157<br>121<br>(134±20)             | 11 , 5<br>10 (9±3)        | 27 , 26<br>23<br>(25±2) | 16 , 15<br>16<br>(16±1)   | 7 , 7<br>2<br>(5±3)  |  |
|                      | 31.3                     | 146 , 134<br>132<br>(137±8)              | 8 , 10<br>7<br>(8±2)      | 16 , 27<br>15<br>(19±7) | 10 , 18<br>18<br>(15±5)   | 7 , 6<br>7<br>(7±1)  |  |
|                      | 62.5                     | 167 , 158<br>164<br>(163±5)              | 7 , 8<br>11<br>(9±2)      | 17 , 22<br>12<br>(17±5) | 20 , 14<br>12<br>(15±4)   | 9 , 7<br>8<br>(8±1)  |  |
|                      | 125                      | 145 , 176<br>146<br>(156±18)             | 3 , 9<br>10<br>(7±4)      | 10 , 24<br>14<br>(16±7) | 11 , 15<br>17<br>(14±3)   | 7 , 7<br>3<br>(6±2)  |  |
|                      | 250                      | 106 , 139<br>116<br>(120±17)             | 10 , 4<br>8<br>(7±3)      | 24 , 20<br>15<br>(20±5) | 16 , 18<br>12<br>(15±3)   | 2 , 7<br>9<br>(6±4)  |  |
|                      | 500                      | 75 * , 77 * 75 * (76±1)                  | 3 * , 3 *<br>3 *<br>(3±0) | 8 * , 14 * 4 * (9±5)    | 1 * , 4 *<br>1 *<br>(2±2) | 2 * , 1 * 6 * (3±3)  |  |
|                      |                          | AF-2                                     | NaN <sub>3</sub>          | AF-2                    | AF-2                      | 9-AA                 |  |
| Positive control     | Concentration (µg/plate) | 0.01                                     | 0.5                       | 0.01                    | 0.1                       | 80                   |  |
|                      | Rev./plate               | 985 , 953<br>914                         | 361 , 343                 | 118 , 127               | 497 , 506                 | 306 , 260            |  |
|                      | (Mean±S.D.)              | (951±36)                                 | 359<br>(354±10)           | 141<br>(129±12)         | 452<br>(485±29)           | 428<br>(331±87)      |  |

a: Dimethyl sulfoxide

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

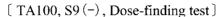
Rev. : Revertants
\* : Growth inhibition

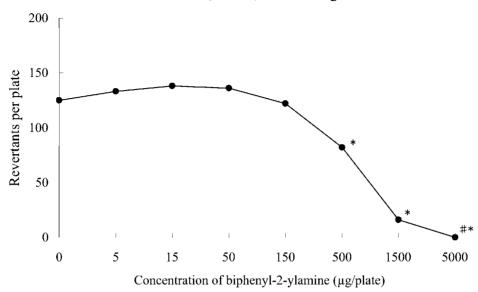
Table 4 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvr A with metabolic activation (main test) (SR05367)

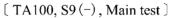
| Compound             | Concentration (µg/plate) | Revertants per plate (Mean±S.D.)  S9(+) |                         |                            |                          |                         |  |
|----------------------|--------------------------|---|-------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|--|
|                      | (µg/ріаіс)               | TA100                                   | TA1535                  | WP2uvr A                   | TA98                     | TA1537                  |  |
| Control <sup>a</sup> |                          | 144 , 153<br>151<br>(149±5)             | 8 , 12<br>9 (10±2)      | 14 , 27<br>15<br>(19±7)    | 30 , 31<br>35 (32±3)     | 9 , 15<br>14<br>(13±3)  |  |
| Biphenyl-2-ylamine   | 7.81                     | 209 , 208<br>206<br>(208±2)             | 6 , 11<br>17<br>(11±6)  | 10 , 26<br>19<br>(18±8)    | 35 , 50<br>31<br>(39±10) | 12 , 17<br>10<br>(13±4) |  |
|                      | 15.6                     | 251 , 247<br>253<br>(250±3)             | 9 , 15<br>17<br>(14±4)  | 19 , 28<br>22<br>(23±5)    | 31 , 30<br>42<br>(34±7)  | 12 , 7<br>16<br>(12±5)  |  |
|                      | 31.3                     | 328 , 242<br>238<br>(269±51)            | 10 , 12<br>12<br>(11±1) | 15 , 27<br>23<br>(22±6)    | 40 , 50<br>45<br>(45±5)  | 9 , 11<br>12<br>(11±2)  |  |
|                      | 62.5                     | 340 , 316<br>334<br>(330±12)            | 17 , 12<br>15<br>(15±3) | 14 , 31<br>25<br>(23±9)    | 56 , 53<br>51<br>(53±3)  | 19 , 8<br>4<br>(10±8)   |  |
|                      | 125                      | 369 , 389<br>390<br>(383±12)            | 15 , 12<br>20<br>(16±4) | 23 , 21<br>35<br>(26±8)    | 60 , 90<br>74<br>(75±15) | 8 , 11<br>11<br>(10±2)  |  |
|                      | 250                      | 391 , 400<br>353<br>(381±25)            | 15 , 12<br>12<br>(13±2) | 29 , 6<br>28<br>(21±13)    | 83 , 78<br>71<br>(77±6)  | 17 , 8<br>12<br>(12±5)  |  |
|                      | 500                      | 335 * , 350 * 359 * (348±12)            | 12 * , 8 * 9 * (10±2)   | 8 * , 8 *<br>10 *<br>(9±1) | 72 * , 66 * 76 * (71±5)  | 10 * , 11 * 9 * (10±1)  |  |
|                      |                          | 2-AA                                    | 2-AA                    | 2-AA                       | 2-AA                     | 2-AA                    |  |
| Positive control     | Concentration (µg/plate) | 1                                       | 2                       | 10                         | 0.5                      | 2                       |  |
|                      | Rev./plate               | 1030 , 975<br>1038                      | 295 , 294<br>286        | 954 , 908                  | 203 , 214<br>179         | 144 , 140<br>136        |  |
|                      | (Mean±S.D.)              | (1014±34)                               | (292±5)                 | 824<br>(895±66)            | (199±18)                 | (140±4)                 |  |

a: Dimethyl sulfoxide

2-AA: 2-Aminoanthracene Rev.: Revertants







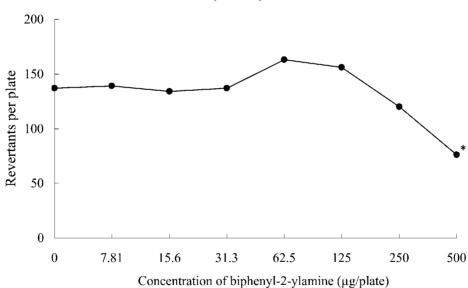
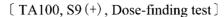
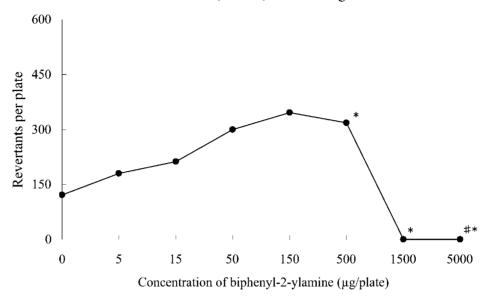
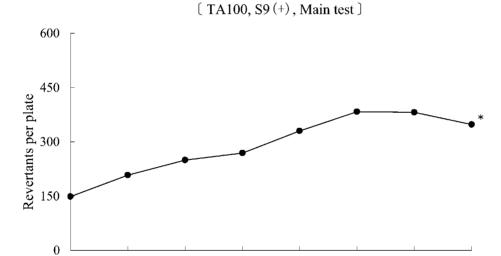


Figure 1-1 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)







31.3

62.5

Concentration of biphenyl-2-ylamine (µg/plate)

125

250

500

Figure 1-2 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)

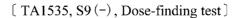
# : Precipitation at the end of treatment

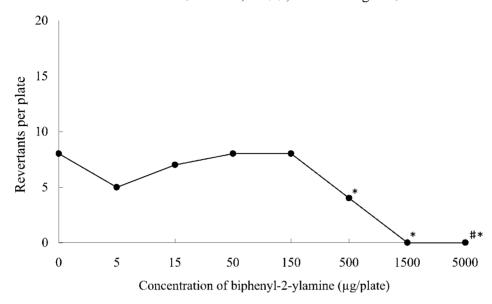
15.6

\* : Growth inhibition

7.81

0





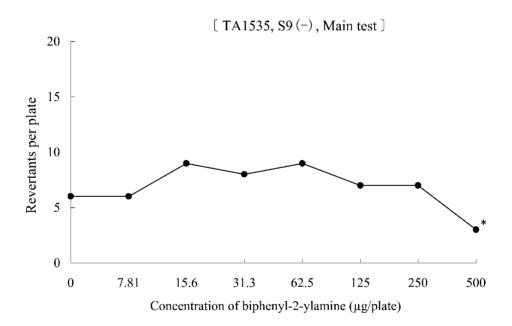
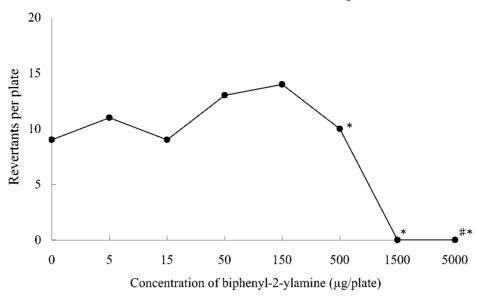


Figure 2-1 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)





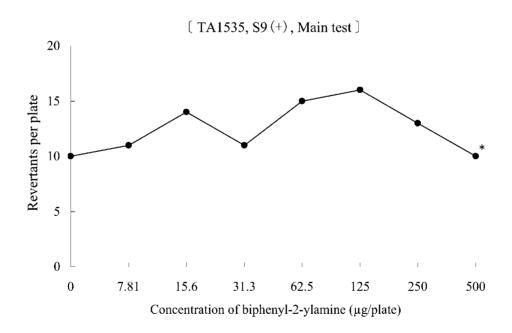
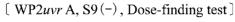
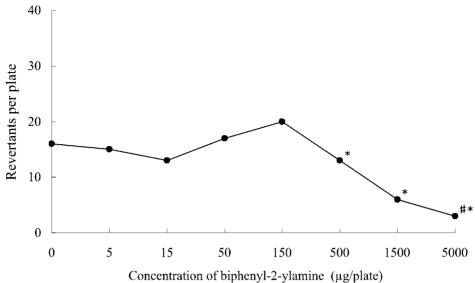


Figure 2-2 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)





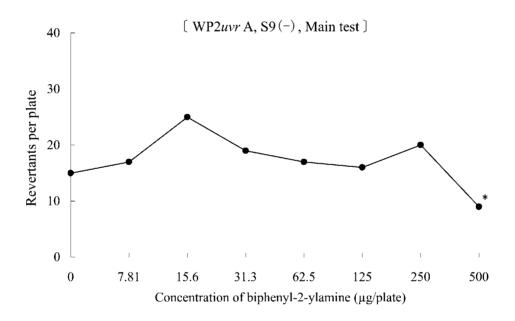
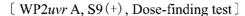
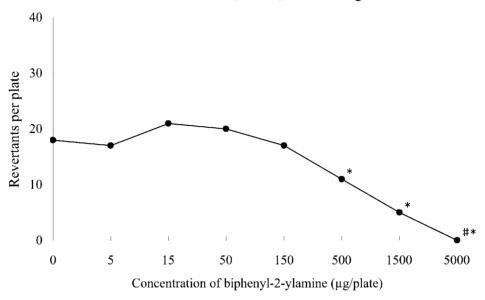


Figure 3-1 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Escherichia coli WP2uvr A without metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)





[ WP2uvr A, S9(+), Main test]

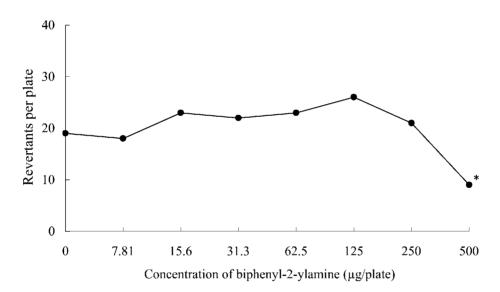
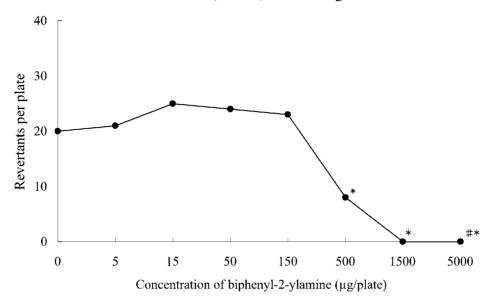


Figure 3-2 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)

#: Precipitation at the end of treatment





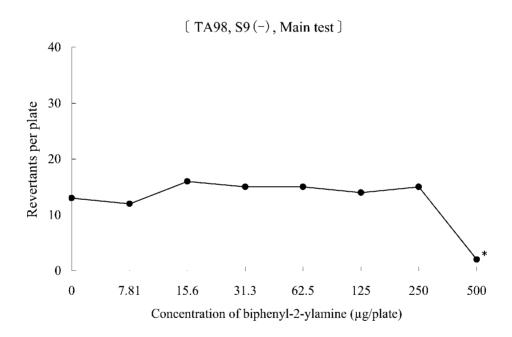
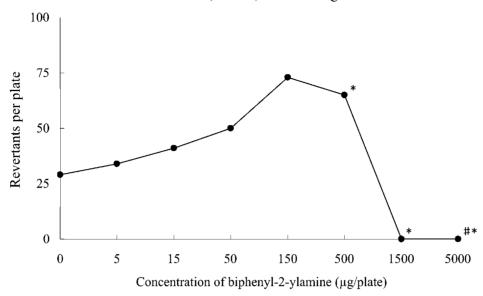


Figure 4-1 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)





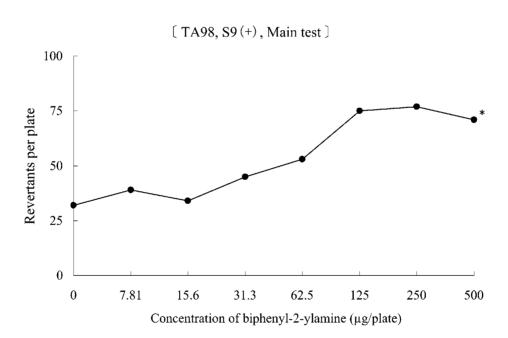
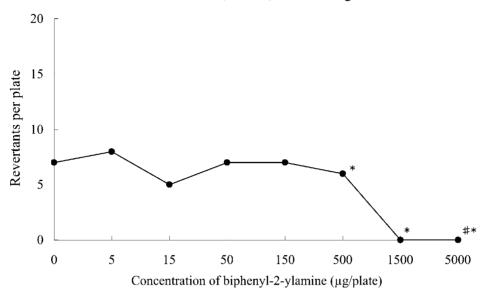
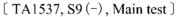


Figure 4-2 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)







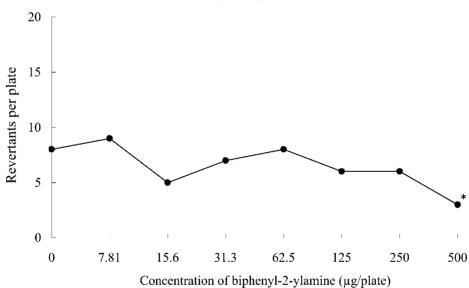
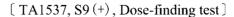
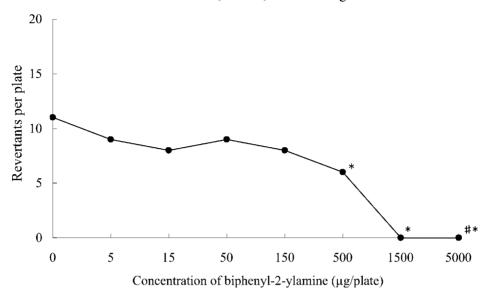


Figure 5-1 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)





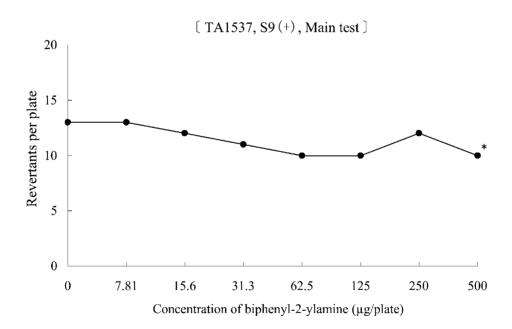


Figure 5-2 Reverse mutation test of biphenyl-2-ylamine in Salmonella typhimurium TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05367)