



4-ニトロ-0-アニシジン
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】

4-ニトロ-*o*-アニシジ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、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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で用量を設定して実施した。ただし、S9 mix 添加試験については、本試験Iで各検定菌とも変異コロニー数が増加し、313または625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ でプラトー値に近い値を示したため、本試験IIでは、用量範囲を31.3~500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に下げて実施した。

その結果、S9 mix 無添加試験ではTA100、TA98 および TA1537 において、S9 mix 添加試験ではすべての検定菌において、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、4-ニトロ-*o*-アニシジンは、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、4-ニトロ-*o*-アニシジンについて、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°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〕

4-ニトロ-*o*-アニシジン (略称: NA、CAS No. 97-52-9) は、分子量 168.15 の黄色粉末である。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 99.4 wt% (不純物: 0.13% 5-ニトロ-*o*-アニシジン、0.13% 2-アセトアミド-4-ニトロアニソール) であり、
から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光保管した。

NA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-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)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-アミノアクリジン (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
リン酸水素二カリウム	10 g	バクトアガー (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
塩化カルウム	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)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検定菌に関しては、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〕

NA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、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

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とともに、313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を 2 として用量を設定し、本試験 I を実施した (Table 2)。その結果、S9 mix 無添加試験では TA100、TA98 および TA1537 において、また S9 mix 添加試験ではすべての検定菌において、溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた。いずれの検定菌においても、S9 mix 添加試験の変異コロニー数は、S9 mix 無添加試験よりも高く、313 または 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ でプラトー値に近い値を示した。そのため、本試験 II は S9 mix 添加試験の用量範囲を 31.3～500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に下げて実施した (Table 3)。

その結果、S9 mix 無添加試験では TA100、TA98 および TA1537 において、S9 mix 添加試験ではすべての検定菌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が認められ、用量依存性もみられた。

すべての検定菌で S9 mix 添加試験の方が無添加試験より変異コロニー数が高かったことから、当被験物質は代謝により変異原性が強まるものと考えられる。各検定菌の比変異活性値を Appendix 2 に示した。当被験物質の最大比変異活性値は、TA100 の S9 mix 添加試験における 20608 (本試験 II、62.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) 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 (693000) の約 30 分の 1 であった。

NA 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。

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 4-nitro- *o*-anisidine 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	127 141 125 (131 ± 8.7)	12 11 13 (12 ± 1.0)	14 26 20 (20 ± 6.0)	19 21 25 (22 ± 3.1)	14 16 21 (17 ± 3.6)											
	313	146 126 147 (140 ± 11.8)	13 6 17 (12 ± 5.6)	21 16 20 (19 ± 2.6)	81 69 52 (67 ± 14.6)	14 15 14 (14 ± 0.6)											
	625	130 157 134 (140 ± 14.6)	9 9 10 (9 ± 0.6)	11 18 16 (15 ± 3.6)	112 109 117 (113 ± 4.0)	17 15 21 (18 ± 3.1)											
	1250	204 171 203 (193 ± 18.8)	8 10 13 (10 ± 2.5)	9 19 17 (15 ± 5.3)	217 194 171 (194 ± 23.0)	51 51 56 (53 ± 2.9)											
	2500	307 331 311 (316 ± 12.9)	10 7 11 (9 ± 2.1)	7 12 7 (9 ± 2.9)	341 321 309 (324 ± 16.2)	111 92 101 (101 ± 9.5)											
	5000 c	404 381 390 (392 ± 11.6)	12 17 8 (12 ± 4.5)	4 7 5 (5 ± 1.5)	433 446 564 (481 ± 72.2)	184 171 162 (172 ± 11.1)											
S9mix (+)	0	148 123 157 (143 ± 17.6)	9 14 6 (10 ± 4.0)	19 23 15 (19 ± 4.0)	33 29 34 (32 ± 2.6)	16 15 18 (16 ± 1.5)											
	313	2146 2508 2519 (2391 ± 212.2)	35 51 52 (46 ± 9.5)	40 46 48 (45 ± 4.2)	2559 2707 2540 (2602 ± 91.4)	252 246 279 (259 ± 17.6)											
	625	2452 2392 2442 (2429 ± 32.1)	66 67 64 (66 ± 1.5)	38 36 38 (37 ± 1.2)	3202 3398 3226 (3275 ± 106.9)	418 389 380 (396 ± 19.9)											
	1250	2119 2078 2037 (2078 ± 41.0)	80 68 74 (74 ± 6.0)	27 37 34 (33 ± 5.1)	3696 3754 3587 (3679 ± 84.8)	520 436 530 (495 ± 51.6)											
	2500	1794 1759 1727 (1760 ± 33.5)	84 86 85 (85 ± 1.0)	12 19 25 (19 ± 6.5)	3239 3051 3707 (3332 ± 337.8)	539 443 434 (472 ± 58.2)											
	5000 c	1537 1537 1376 (1483 ± 93.0)	67 75 96 (79 ± 15.0)	17 4 11 (11 ± 6.5)	3255 3459 3615 (3443 ± 180.5)	412 433 359 (401 ± 38.1)											
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											
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	839 894 827 (853 ± 35.7)	261 207 191 (220 ± 36.7)	491 612 552 (552 ± 60.5)	636 654 707 (666 ± 36.9)	1244 1349 1241 (1278 ± 61.5)											
	Number of colonies / plate	824 614 766 (735 ± 108.4)	292 328 268 (296 ± 30.2)	491 516 467 (491 ± 24.5)	361 396 349 (369 ± 24.4)	379 354 327 (353 ± 26.0)											

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

c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 99.4 wt% and 0.13% 5-nitro-*o*-anisidine and 0.13% 2-acetamido-4-nitroanisole were contained as impurities.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 4-nitro- *o*-anisidine 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	140	108	146	12	13	12	18	17	32	22	21	16	16	15	16
		(131 \pm 20.4)			(12 \pm 0.6)			(22 \pm 8.4)			(20 \pm 3.2)			(16 \pm 0.6)		
	313	126	150	142	12	9	7	20	20	17	69	90	69	7	13	12
		(139 \pm 12.2)			(9 \pm 2.5)			(19 \pm 1.7)			(76 \pm 12.1)			(11 \pm 3.2)		
	625	167	144	158	12	11	10	25	22	29	94	118	95	32	30	33
		(156 \pm 11.6)			(11 \pm 1.0)			(25 \pm 3.5)			(102 \pm 13.6)			(32 \pm 1.5)		
	1250	205	225	200	9	10	9	26	39	21	183	188	205	59	59	61
		(210 \pm 13.2)			(9 \pm 0.6)			(29 \pm 9.3)			(192 \pm 11.5)			(60 \pm 1.2)		
2500	319	317	305	4	14	4	19	22	21	374	324	425	111	109	105	
	(314 \pm 7.6)			(7 \pm 5.8)			(21 \pm 1.5)			(374 \pm 50.5)			(108 \pm 3.1)			
5000 c	381	391	343	16	14	7	6	12	5	491	568	499	237	211	213	
	(372 \pm 25.3)			(12 \pm 4.7)			(8 \pm 3.8)			(519 \pm 42.3)			(220 \pm 14.5)			
S9mix (+)	0	131	143	142	12	17	14	28	23	30	27	34	26	25	11	22
		(139 \pm 6.7)			(14 \pm 2.5)			(27 \pm 3.6)			(29 \pm 4.4)			(19 \pm 7.4)		
	31.3	585	672	674	20	27	20	30	35	35	114	181	223	23	17	30
		(644 \pm 50.8)			(22 \pm 4.0)			(33 \pm 2.9)			(173 \pm 55.0)			(23 \pm 6.5)		
	62.5	1352	1492	1436	41	18	21	47	41	37	611	628	672	56	65	51
		(1427 \pm 70.5)			(27 \pm 12.5)			(42 \pm 5.0)			(637 \pm 31.5)			(57 \pm 7.1)		
	125	2463	2247	2187	42	39	51	50	56	46	1629	1685	1570	131	139	157
		(2299 \pm 145.2)			(44 \pm 6.2)			(51 \pm 5.0)			(1628 \pm 57.5)			(142 \pm 13.3)		
250	2240	2314	2510	59	59	55	41	51	55	2556	2140	2796	220	209	235	
	(2355 \pm 139.5)			(58 \pm 2.3)			(49 \pm 7.2)			(2497 \pm 331.9)			(221 \pm 13.1)			
500	2189	2246	2471	71	72	75	63	59	60	3295	3137	3277	353	361	361	
	(2302 \pm 149.1)			(73 \pm 2.1)			(61 \pm 2.1)			(3236 \pm 86.5)			(358 \pm 4.6)			
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	738	727	751	266	263	261	304	266	291	757	756	741	1214	852	1028
		(739 \pm 12.0)			(263 \pm 2.5)			(287 \pm 19.3)			(751 \pm 9.0)			(1031 \pm 181.0)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	858	806	833	294	270	301	670	615	543	379	363	394	390	324	435
		(832 \pm 26.0)			(288 \pm 16.3)			(609 \pm 63.7)			(379 \pm 15.5)			(383 \pm 55.8)		

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

c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 99.4 wt% and 0.13% 5-nitro-*o*-anisidine and 0.13% 2-acetamido-4-nitroanisole were contained as impurities.