N－エチルアニリン 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

材料および試験方法 …… 3

試験結果および考察 …… 6

参　考　文　献 …… 7

Tables　　1～3

【要　　約】

N-エチルアニリンの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvr*A を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験では、50～5000 μg/プレート で実施したところ、最高用量の 5000 μg/プレート の用量で抗菌性が認められたので、本試験では直接法、代謝活性化法ともに 78.13～2500 μg/プレート の用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも陰性対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められなかったことから、*N*-エチルアニリンは、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）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、*N*-エ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ート法により実施した。

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[(1)]、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[(2)]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直接法と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）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代謝活性化法とからなっている。

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。

【材料および試験方法】

〔検　定　菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvr*A
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の４菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、

から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvr*A 株は1979年５月９日に　　から分与を受けた。

検定菌は、－80℃以下で凍結保存した。各検定菌は、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（pKM101）の有無についての特性確認を行った。

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字型試験管に種菌を接種し、37℃、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〕

N-エチルアニリン（CAS No. 103-69-5、以下ＥＡと略）は、分子量 121.18 の淡黄色ないし淡褐色透明液体である。純度 99.6%のもの（ロット番号：　　不純物として、*N*,*N*-ジエチルアニリン（0.37%）およびアニリン（0.02%）を含む、　　）を　　から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

ＥＡは、ジメチルスルホキシド（以下 DMSO と略、ロット番号：APQ5928 および APJ3434、和光純薬工業㈱）に 50 あるいは 25 mg/mℓ になるように調製した後、同溶媒で更に公比２ないし約３で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

秦野研究所において、ＥＡの DMSO 溶液中での安定性試験を、溶媒が共通であるので、本試験での低濃度（0.7813 mg/mℓ）および当研究所で同時に実施した染色体異常試験（H-93-263）での高濃度（220 mg/mℓ）の２濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後４時間における各３サンプルの平均含量は、それぞれ初期値（０時間）の平均に対して、95.3および 102%であった。これらの値は、当研究所で規定した許容範囲内にあった（Appendix 1、2）。

また、本試験Ⅱに用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、0.7813 mg/mℓ 溶液の含量は既定濃度に対し 103%、25.00 mg/mℓ 溶液は、100～102%であった。これらの値も当研究所の規定した許容範囲内であった（Appendix 3）。

以上の結果から、ＥＡは DMSO 溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔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	： ﾌﾘﾙﾌﾗﾏｲﾄﾞ	（上野製薬㈱	ﾛｯﾄ番号 46,	純度99.9%）
SA	： ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	（和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度90%以上）
9AA	： 9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	（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㈱	ﾛｯﾄ番号 DSF2950,	純度90%以上）

AF2, 2AA は DMSO（和光純薬工業㈱）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 は蒸留水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 混液の組成〕

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) ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco)	0.6%	(B)* L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5%	ﾋﾞｵﾁﾝ	0.5 mM

＊ ： WP2 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、日清製粉株式会社製の最少寒天培地（用量設定試験では、ロット番号：DJ020GI、1993年７月６日製造および本試験では、ロット番号：DJ030JI、1993年10月４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。

硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ・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	ｸﾞﾙｺｰｽ	20 g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10 g	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (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 混液（1 mℓ中下記の成分を含む）

S9**	0.1 mℓ	NADH	4 μmol
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	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
ｸﾞﾙｺｰｽ-6-ﾘﾝ酸	5 μmol		

** ：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㈱、ロット番号 RAA-297、1993年8月27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ある。

〔試 験 方 法〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトップアガー2 mℓ、被験物質調製液 0.1 mℓ、リン酸緩衝液 0.5 mℓ（代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 mℓ）、検定菌液 0.1 mℓ を混合したのち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 DMSO、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 Table 1～3に示した。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、陰性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、再現性の確認を行った。

〔判 定 基 準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、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、陰性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。

【試験結果および考察】

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。

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。ＥＡについて、50～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で公比を約 3 とし、試験を実施したところ、すべての検定菌において直接法、代謝活性化法ともに 5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量で、強い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を、すべての検定菌において、直接法、代謝活性化法ともに 2500 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ とすることとした。

〔本試験〕

結果を Table 2 、 3 に示した。ＥＡについて、すべての検定菌について、直接法、代謝活性化法ともに 78.13～2500 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で、公比を 2 とし、試験を実施した。2 回の試験を通して、用いた 5 種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての検定菌において、高用量の 1250～2500 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 群において、抗菌性が認められた。

ＥＡについて実施した試験において、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、陰性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。

以上の結果に基づき、ＥＡ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。

【参 考 文 献】

(1) Maron, D.M. and Ames, B.N.: Mutation Research. 113: 173-215 (1983)

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

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of N-Ethylaniline ** 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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	99 99 127 (108 ± 16.2)	9 5 13 (9 ± 4.0)	20 13 20 (18 ± 4.0)	18 21 19 (19 ± 1.5)	12 5 12 (10 ± 4.0)	
	50	86	9	18	16	6	
	150	103	9	10	20	4	
	500	89	9	12	11	4	
	1500	87	18	22	20	5	
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
S9Mix (+)	0	101 115 105 (107 ± 7.2)	14 10 9 (11 ± 2.6)	27 21 14 (21 ± 6.5)	31 23 28 (27 ± 4.0)	15 10 9 (11 ± 3.2)	
	50	145	8	21	32	10	
	150	159	17	23	41	9	
	500	128	10	20	37	9	
	1500	135	9	22	36	11	
	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	
	Number of colonies / plate	590 536 564 (563 ± 27.0)	167 154 163 (161 ± 6.7)	189 153 166 (169 ± 18.2)	673 682 742 (699 ± 37.5)	1214 1231 1482 (1309 ± 150.1)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	375 377 386 (379 ± 5.9)	215 226 201 (214 ± 12.5)	979 852 1087 (973 ± 117.6)	156 141 149 (149 ± 7.5)	212 230 210 (217 ± 11.0)	

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 99.6 % and N,N-diethylaniline (0.37 %) and aniline (0.02 %) were contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of N-Ethylaniline** 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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	90 104 80 (91 ± 12.1)	12 6 7 (8 ± 3.2)	29 22 22 (24 ± 4.0)	19 20 21 (20 ± 1.0)	10 8 6 (8 ± 2.0)	
	78.13	102 97 91 (97 ± 5.5)	8 15 11 (11 ± 3.5)	20 19 17 (19 ± 1.5)	8 17 13 (13 ± 4.5)	8 9 4 (7 ± 2.6)	
	156.3	114 99 106 (106 ± 7.5)	12 10 9 (10 ± 1.5)	23 24 18 (22 ± 3.2)	19 25 22 (22 ± 3.0)	8 11 7 (9 ± 2.1)	
	312.5	74 122 103 (100 ± 24.2)	9 14 10 (11 ± 2.6)	18 22 25 (22 ± 3.5)	22 10 24 (19 ± 7.6)	4 8 4 (5 ± 2.3)	
	625	88 89 87 (88 ± 1.0)	8 11 8 (9 ± 1.7)	14 24 16 (18 ± 5.3)	28 20 12 (20 ± 8.0)	4 2 3 (3 ± 1.0)	
	1250	99 102 92 (98 ± 5.1)	9 13 9 (10 ± 2.3)	15 17 22 (18 ± 3.6)	11 19 15 (15 ± 4.0)	2 6 8 (5 ± 3.1)	
	2500	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	12 * 6 * 0 * (6 ± 6.0)	0 * 12 * 6 * (6 ± 6.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
S9Mix (+)	0	104 117 114 (112 ± 6.8)	5 14 10 (10 ± 4.5)	22 31 24 (26 ± 4.7)	42 31 17 (30 ± 12.5)	8 8 15 (10 ± 4.0)	
	78.13	151 142 122 (138 ± 14.8)	17 15 9 (14 ± 4.2)	21 21 29 (24 ± 4.6)	37 32 32 (34 ± 2.9)	17 11 7 (12 ± 5.0)	
	156.3	123 119 127 (123 ± 4.0)	12 18 9 (13 ± 4.6)	26 33 26 (28 ± 4.0)	29 46 42 (39 ± 8.9)	18 10 16 (15 ± 4.2)	
	312.5	155 122 130 (136 ± 17.2)	14 12 15 (14 ± 1.5)	23 25 27 (25 ± 2.0)	29 37 39 (35 ± 5.3)	15 16 14 (15 ± 1.0)	
	625	133 151 119 (134 ± 16.0)	17 16 16 (16 ± 0.6)	22 12 18 (17 ± 5.0)	48 36 31 (38 ± 8.7)	23 7 17 (16 ± 8.1)	
	1250	127 125 131 (128 ± 3.1)	12 15 6 (11 ± 4.6)	23 29 17 (23 ± 6.0)	41 49 39 (43 ± 5.3)	13 10 13 (12 ± 1.7)	
	2500	107 * 116 * 100 * (108 ± 8.0)	8 * 11 * 10 * (10 ± 1.5)	16 * 10 * 13 * (13 ± 3.0)	11 * 20 * 29 * (20 ± 9.0)	4 * 0 * 0 * (1 ± 2.3)	
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	470 502 470 (481 ± 18.5)	250 251 231 (244 ± 11.3)	130 155 139 (141 ± 12.7)	748 765 762 (758 ± 9.1)	1171 1192 1169 (1177 ± 12.7)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	890 857 881 (876 ± 17.1)	204 198 230 (211 ± 17.0)	925 1427 1285 (1212 ± 258.8)	347 321 315 (328 ± 17.0)	224 261 238 (241 ± 18.7)	

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 99.6 % and N,N-diethylaniline (0.37 %) and aniline (0.02 %) were contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of N-Ethylaniline** 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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	112 83 88 (94 ± 15.5)	14 14 6 (11 ± 4.6)	22 24 27 (24 ± 2.5)	30 18 22 (23 ± 6.1)	6 6 11 (8 ± 2.9)	
	78.13	137 90 81 (103 ± 30.1)	13 15 11 (13 ± 2.0)	21 18 7 (15 ± 7.4)	27 24 18 (23 ± 4.6)	10 4 9 (8 ± 3.2)	
	156.3	79 122 83 (95 ± 23.8)	17 9 22 (16 ± 6.6)	19 19 17 (18 ± 1.2)	16 20 16 (17 ± 2.3)	14 8 8 (10 ± 3.5)	
	312.5	86 86 91 (88 ± 2.9)	11 11 12 (11 ± 0.6)	12 18 11 (14 ± 3.8)	19 11 20 (17 ± 4.9)	6 5 4 (5 ± 1.0)	
	625	115 97 104 (105 ± 9.1)	11 9 9 (10 ± 1.2)	16 11 13 (13 ± 2.5)	26 22 25 (24 ± 2.1)	10 6 3 (6 ± 3.5)	
	1250	104 * 106 * 81 * (97 ± 13.9)	6 * 4 * 11 * (7 ± 3.6)	17 12 16 (15 ± 2.6)	33 29 24 (29 ± 4.5)	9 8 6 (8 ± 1.5)	
	2500	7 * 99 * 98 * (68 ± 52.8)	0 * 5 * 0 * (2 ± 2.9)	11 * 12 * 14 * (12 ± 1.5)	9 * 15 * 16 * (13 ± 3.8)	6 * 0 * 0 * (2 ± 3.5)	
S9Mix (+)	0	108 94 118 (107 ± 12.1)	15 15 17 (16 ± 1.2)	25 21 23 (23 ± 2.0)	33 25 33 (30 ± 4.6)	11 9 16 (12 ± 3.6)	
	78.13	122 118 108 (116 ± 7.2)	17 9 16 (14 ± 4.4)	26 27 21 (25 ± 3.2)	26 35 28 (30 ± 4.7)	9 12 14 (12 ± 2.5)	
	156.3	122 144 139 (135 ± 11.5)	17 10 12 (13 ± 3.6)	20 31 26 (26 ± 5.5)	36 35 47 (39 ± 6.7)	10 10 11 (10 ± 0.6)	
	312.5	120 125 114 (120 ± 5.5)	16 14 8 (13 ± 4.2)	24 21 19 (21 ± 2.5)	43 35 45 (41 ± 5.3)	13 15 10 (13 ± 2.5)	
	625	130 145 104 (126 ± 20.7)	6 14 11 (10 ± 4.0)	22 24 17 (21 ± 3.6)	45 39 49 (44 ± 5.0)	10 20 25 (18 ± 7.6)	
	1250	105 * 122 * 157 * (128 ± 26.5)	10 18 16 (15 ± 4.2)	26 22 17 (22 ± 4.5)	42 38 39 (40 ± 2.1)	14 * 11 * 15 * (13 ± 2.1)	
	2500	27 * 89 * 110 * (75 ± 43.2)	6 * 6 * 6 * (6 ± 0.0)	13 * 18 * 13 * (15 ± 2.9)	36 * 39 * 34 * (36 ± 2.5)	8 * 6 * 8 * (7 ± 1.2)	
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	359 365 347 (357 ± 9.2)	209 215 208 (211 ± 3.8)	141 107 98 (115 ± 22.7)	695 711 756 (721 ± 31.6)	1328 1216 1274 (1273 ± 56.0)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	718 721 647 (695 ± 41.9)	194 188 199 (194 ± 5.5)	1100 1225 1091 (1139 ± 74.9)	386 371 409 (389 ± 19.1)	271 272 258 (267 ± 7.8)	

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 99.6 % and N,N-diethylaniline (0.37 %) and aniline (0.02 %) were contained as impurity.