



m-トリイジンの
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】

m-トルイ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、陰性の結果を得た。

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ート法により用量設定試験および本試験を行った。用量設定試験を 50.0~5000 µg/プレート の用量で行ったところ、S9 mix 無添加、添加のいずれの条件においても最高用量での抗菌性は認められなかった。したがって、本試験における S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも、313~5000 µg/プレート の範囲で用量を設定し、試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、m-トルイジンは、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、*m*-トルイジンについて、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、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日にアメリカ合衆国、
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〕

m-トルイジン (CAS No. 108-44-1) は、分子量 107.15 の無色～淡黄色の液体である。構造式等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は のロット番号
純度 99.8% (不純物：*o*-トルイジン 0.03%、*p*-トルイジン 0.04%、*o*-エチルアニリン 0.08%) のものを厚生省から入手した。被験物質は、使用時まで冷蔵遮光保管した。

m-トルイジンは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号：KCG5200、和光純薬工業(株)) に 50 mg/ml の濃度に溶解した後、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。

m-トルイジンの DMSO 溶液中での安定性試験および含量測定試験を、本試験Ⅱにおいて調製した低濃度 (3.13 mg/ml) 溶液および高濃度 (50.0 mg/ml) 溶液について、秦野研究所において実施した。安定性試験においては 3.13 mg/ml および 50.0 mg/ml のいずれの溶液も、室温遮光条件下で調製後 4 時間までの安定性を調べた。その結果、調製 4 時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値 (0 時間) の平均値に対して、99.7 および

99.5%であった。これらの値は当研究所で規定している基準内（4時間後における平均含量が初期値の90%以上）であった（Appendix 2）。

また、同一の被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、いずれも当研究所で規定している基準内（溶媒中での平均含量が添加量の90から110%）であった（Appendix 3）。

〔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-アミノアクリン (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, 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%	ピオチン	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、日清製粉(株)製の最少寒天培地（ロット番号：DJ010BK、1995年2月6日製造および DJ020CK、1995年3月6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
リン酸水素二カルシウム	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 μmol
塩化マグネシウム	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
グルコース-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 (キッコーマン株、ロット番号 RAA-321、1995年1月20日製造および RAA-326、同年4月28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]

プレート法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中にトッパアガー 2 ml、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、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。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。

〔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。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。m-トルイジンについて 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 として、試験を実施したところ、S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも最高用量の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ まで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のいずれも 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

2 回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。m-トルイジンの用量を、S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも、313~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を 2 として設定し試験を実施した。

その結果、2 回の試験とも TA100 の S9 mix 添加試験において、変異コロニー数が増加したが、溶媒対照値の 2 倍には至らなかった。TA100 の S9 mix 無添加試験および他の 4 種の検定菌においては、S9 mix 無添加および添加試験のいずれにおいても、変異コロニー数の増加は認められなかった。

m-トルイジン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、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。

【結 論】

以上の結果に基づき、*m*-トルイジンは、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。

【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) 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 m-toluidine* on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	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	88	108	105	22	10	19	15	20	22	24	20	28	10	5	9	
		(100 \pm 10.8)			(17 \pm 6.2)			(19 \pm 3.6)			(24 \pm 4.0)			(8 \pm 2.6)			
	50.0	101			17			25			23			6			
	150	114			12			17			17			8			
	500	109			17			18			23			11			
	1500	126			12			23			16			3			
	5000	104			11			7			18			4			
S9mix (+)	0	132	118	108	18	10	15	32	22	25	29	22	44	15	19	8	
		(119 \pm 12.1)			(14 \pm 4.0)			(26 \pm 5.1)			(32 \pm 11.2)			(14 \pm 5.6)			
	50.0	134			18			25			34			16			
	150	133			23			27			21			17			
	500	136			20			22			27			15			
	1500	145			16			25			39			7			
	5000	156			16			17			35			6			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	613	568	524	243	226	199	98	116	108	794	808	814	1826	1850	1727	
		(568 \pm 44.5)			(223 \pm 22.2)			(107 \pm 9.0)			(805 \pm 10.3)			(1801 \pm 65.2)			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	874	1025	1185	289	274	280	970	1017	985	308	296	314	223	204	189	
		(1028 \pm 155.5)			(281 \pm 7.5)			(991 \pm 24.0)			(306 \pm 9.2)			(205 \pm 17.0)			

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

*: Purity was above 99.8% and 0.03% of o-toluidine, 0.04% of p-toluidine and 0.08% of o-ethylaniline were contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of m-toluidine** 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	115	118	102	7	14	15	26	17	23	20	26	22	9	5	13	
		(112 ± 8.5)			(12 ± 4.4)			(22 ± 4.6)			(23 ± 3.1)			(9 ± 4.0)			
	313	106	102	91	16	12	12	25	33	22	25	28	22	8	16	5	
		(100 ± 7.8)			(13 ± 2.3)			(27 ± 5.7)			(25 ± 3.0)			(10 ± 5.7)			
	625	106	98	101	18	11	13	25	28	29	27	29	14	11	11	5	
		(102 ± 4.0)			(14 ± 3.6)			(27 ± 2.1)			(23 ± 8.1)			(9 ± 3.5)			
	1250	121	124	129	10	11	11	24	18	18	27	28	31	8	8	3	
		(125 ± 4.0)			(11 ± 0.6)			(20 ± 3.5)			(29 ± 2.1)			(6 ± 2.9)			
2500	127	132	131	12	10	11	17	17	16	21	33	22	5	14	6		
	(130 ± 2.6)			(11 ± 1.0)			(17 ± 0.6)			(25 ± 6.7)			(8 ± 4.9)				
5000	126	113	104	4 *	5 *	8 *	12	23	20	22 *	18 *	19 *	6 *	9 *	4 *		
	(114 ± 11.1)			(6 ± 2.1)			(18 ± 5.7)			(20 ± 2.1)			(6 ± 2.5)				
S9mix (+)	0	146	116	122	19	14	14	28	24	27	19	31	31	10	6	7	
		(128 ± 15.9)			(16 ± 2.9)			(26 ± 2.1)			(27 ± 6.9)			(8 ± 2.1)			
	313	130	149	129	16	7	8	21	21	23	31	37	37	14	11	8	
		(136 ± 11.3)			(10 ± 4.9)			(22 ± 1.2)			(35 ± 3.5)			(11 ± 3.0)			
	625	148	146	164	15	13	14	29	31	23	30	37	40	7	12	7	
		(153 ± 9.9)			(14 ± 1.0)			(28 ± 4.2)			(36 ± 5.1)			(9 ± 2.9)			
	1250	145	166	146	10	15	11	21	28	21	33	51	44	13	7	11	
		(152 ± 11.8)			(12 ± 2.6)			(23 ± 4.0)			(43 ± 9.1)			(10 ± 3.1)			
2500	146	144	134	12	18	17	18	29	25	37	33	37	7	7	11		
	(141 ± 6.4)			(16 ± 3.2)			(24 ± 5.6)			(36 ± 2.3)			(8 ± 2.3)				
5000	152	182	157	14 *	9 *	7 *	6	14	21	44	42	39	8 *	12 *	16 *		
	(164 ± 16.1)			(10 ± 3.6)			(14 ± 7.5)			(42 ± 2.5)			(12 ± 4.0)				
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	1072	1037	979	215	214	231	777	793	867	307	295	302	156	166	188	
		(1029 ± 47.0)			(220 ± 9.5)			(812 ± 48.0)			(301 ± 6.0)			(170 ± 16.4)			

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 above 99.8% and 0.03% of o-toluidine, 0.04% of p-toluidine and 0.08% of o-ethylaniline were contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of m-toluidine** 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			
S9 mix (-)	0	118	124	136	11	13	13	18	16	18	18	21	28	14	7	5	
		(126 \pm 9.2)			(12 \pm 1.2)			(17 \pm 1.2)			(22 \pm 5.1)			(9 \pm 4.7)			
	313	125	130	117	12	8	18	27	22	28	23	22	24	7	8	10	
		(124 \pm 6.6)			(13 \pm 5.0)			(26 \pm 3.2)			(23 \pm 1.0)			(8 \pm 1.5)			
	625	105	128	127	22	15	10	28	24	28	29	26	31	15	12	9	
		(120 \pm 13.0)			(16 \pm 6.0)			(27 \pm 2.3)			(29 \pm 2.5)			(12 \pm 3.0)			
	1250	125	121	104	11	9	8	23	28	17	25	26	16	8	13	15	
		(117 \pm 11.2)			(9 \pm 1.5)			(23 \pm 5.5)			(22 \pm 5.5)			(12 \pm 3.6)			
	2500	121	135	135	8	13	11	26	19	22	32	23	25	11	11	6	
	(130 \pm 8.1)			(11 \pm 2.5)			(22 \pm 3.5)			(27 \pm 4.7)			(9 \pm 2.9)				
5000	119	137	148	11	10	8	16	30	21	24	28	20	4	8	8		
	(135 \pm 14.6)			(10 \pm 1.5)			(22 \pm 7.1)			(24 \pm 4.0)			(7 \pm 2.3)				
S9 mix (+)	0	117	110	117	9	20	20	20	30	29	35	38	27	17	10	14	
		(115 \pm 4.0)			(16 \pm 6.4)			(26 \pm 5.5)			(33 \pm 5.7)			(14 \pm 3.5)			
	313	180	174	165	18	10	12	27	25	34	39	43	29	17	14	20	
		(173 \pm 7.5)			(13 \pm 4.2)			(29 \pm 4.7)			(37 \pm 7.2)			(17 \pm 3.0)			
	625	181	171	155	15	15	12	26	33	30	42	45	36	22	13	17	
		(169 \pm 13.1)			(14 \pm 1.7)			(30 \pm 3.5)			(41 \pm 4.6)			(17 \pm 4.5)			
	1250	174	152	141	11	13	19	26	35	30	39	47	35	20	15	15	
		(156 \pm 16.8)			(14 \pm 4.2)			(30 \pm 4.5)			(40 \pm 6.1)			(17 \pm 2.9)			
	2500	155	168	162	9	17	11	28	22	26	38	36	40	16	11	11	
	(162 \pm 6.5)			(12 \pm 4.2)			(25 \pm 3.1)			(38 \pm 2.0)			(13 \pm 2.9)				
5000	161	126	150	9	4	12	19	27	29	40	38	40	10 *	18 *	10 *		
	(146 \pm 17.9)			(8 \pm 4.0)			(25 \pm 5.3)			(39 \pm 1.2)			(13 \pm 4.6)				
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			
	Number of colonies / plate	657	622	533	219	226	247	128	96	98	893	927	944	1123	1280	1497	
		(604 \pm 63.9)			(231 \pm 14.6)			(107 \pm 17.9)			(921 \pm 26.0)			(1300 \pm 187.8)			
	Number of colonies / plate	1125	1090	1130	204	215	278	853	841	912	316	358	326	174	204	205	
		(1115 \pm 21.8)			(232 \pm 39.9)			(869 \pm 38.0)			(333 \pm 21.9)			(194 \pm 17.6)			

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 above 99.8% and 0.03% of o-toluidine, 0.04% of p-toluidine and 0.08% of o-ethylaniline were contained as impurity.