

# 最終報告書

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート細菌を用いた復帰突然変異試験

(試験番号：96-066)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

Study No. 96-066

## 目 次

要約	1 頁
試験目的	3
材料および方法	3
1. 被験物質	3
2. 指標菌株	4
3. 指標菌株の検査	4
4. 指標菌株の保存と前培養	4
5. S9 mix	5
6. 被験物質の供試液の調製	6
7. 陰性対照および陽性対照	6
8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製	7
9. 濃度設定試験（予備試験）	7
10. 本試験	7
1) 濃度設定	7
2) 実験方法	7
(1) プレインキュベーション法（直接法）	7
(2) プレインキュベーション法（代謝活性化法）	8
11. 無菌試験	8
12. 試験の有効性	8
13. 結果の判定	9
結果	9
1. 濃度設定試験	9
2. 本試験	10
3. 確認試験	10
4. 比変異活性	11
結論および参考事項	11
参考文献	12

表：

表 1-1	S9 mix 非存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート の復帰突然変異試験結果〔濃度設定試験-直接法〕	14
表 1-2	S9 mix 存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート の復帰突然変異試験結果〔濃度設定試験-代謝活性化法〕	15
表 2-1	S9 mix 非存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート の復帰突然変異試験結果〔本試験 1 回目-直接法〕	16
表 2-2	S9 mix 存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート の復帰突然変異試験結果〔本試験 1 回目-代謝活性化法〕	17
表 3-1	S9 mix 非存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート の復帰突然変異試験結果〔本試験 2 回目-直接法〕	18
表 3-2	S9 mix 存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート の復帰突然変異試験結果〔本試験 2 回目-代謝活性化法〕	19
表 4	S9 mix 存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート の復帰突然変異試験結果〔確認試験-直接法〕	20

図：

図 1-1	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート 復帰突然変異試験結果-濃度設定試験	21
図 1-2	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート 復帰突然変異試験結果-濃度設定試験	22
図 1-3	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート 復帰突然変異試験結果-濃度設定試験	23
図 2-1	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート 復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目	24
図 2-2	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート 復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目	25
図 2-3	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート 復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目	26

図 3-1	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート	
	復帰突然変異試験結果-本試験2回目	27
図 3-2	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート	
	復帰突然変異試験結果-本試験2回目	28
図 3-3	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート	
	復帰突然変異試験結果-本試験2回目	29
図 4	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート	
	復帰突然変異試験結果-確認試験	30

## 要 約

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、S9 mix 非存在（直接法）および存在（代謝活性化法）下でプレインキュベーション法により行った。156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度を設定して行った濃度設定試験では、直接法において TA98 および TA1537の 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度で菌の生育阻害が認められ、また、2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度で陰性対照（溶媒対照）と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。直接法のその他の指標菌株並びに代謝活性化法における全ての菌株では生育阻害は認められず、また、復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。

したがって、本試験は濃度設定試験と同様、いずれの指標菌株とも 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高濃度とし、以下公比2で計6濃度を用いて行った。その結果、2回の本試験とも、直接法の TA1537においてのみ 2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度で陰性対照値の2倍を越える復帰変異コロニー数の増加が認められた。しかし、この TA1537の復帰変異コロニー数の増加は、濃度依存的ではなかった。また、濃度設定試験と同様、TA98 および TA1537の 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度では菌の生育阻害が認められた。直接法のその他の指標菌株並びに代謝活性化法における全ての菌株では、生育阻害は認められず、また、復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。

濃度設定試験および2回の本試験ともに直接法の TA1537 の 2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度で復帰変異コロニー数の増加が認められたが、濃度依存性は明らかではなかった。また、TA98 において濃度設定試験では 2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で陰性対照値の2倍を越える復帰変異コロニー数の増加が認められたが、2回の本試験では増加傾向を示すにとどまった。そこで、この2菌株について 2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度から抗菌性が認められた 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度間に復帰変異コロニー数の増加が認められるか否か、また、明らかな濃度依存性が得られるか否かを調べる目的で、1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 および 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度を設定し、直接法による確認試験を行った。

その結果、両菌株とも 3500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の濃度で菌の生育阻害が認められた。

TA1537 では 2500 および 3000  $\mu\text{g}$ /プレート濃度で復帰変異コロニー数の増加が認められ、濃度依存性も認められた。TA98 では 2000~3500  $\mu\text{g}$ /プレート濃度で復帰変異コロニー数の増加傾向は認められたものの、陰性対照値の 2 倍を越えるものではなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート  
の細菌に対する突然変異誘発性は陽性と判定した。また、本被験物質の比変異活性値は、  
3.6/mgであった。

## 試験目的

この試験は、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの細菌に対する突然変異誘発性の有無を明らかにするために実施した。

## 材料および方法<sup>1), 2)</sup>

### 1. 被験物質

名称(略号) : 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート (DMMA)

別名 メタクリル酸ジメチルアミノエチル

CAS番号 : 2867-47-2

ロット番号 :

純 度 : 99.9 % (平成8年9月17日分析)

[不純物 ハイドロキノンモノメチルエーテル : 2000 ppm (重合防止剤として添加); ジメチルアミノエタノール : 0.1%以下; メチルメタクリレート : 0.02%以下]

入手先(製造元) :

入 手 日 :

入 手 量 : 25 g

物 性 等 :

化学名 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート  
[ 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate ]

示 性 式  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

分子式  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$

分子量 157.22

性状(常温) 無色透明の液体

沸 点 182~192 °C

融 点 約-30°C

蒸 気 圧  $1.07 \times 10^5$  mPa

溶 解 性 水, アセトン, DMSOに可溶

安 定 性 : 安定 [実験終了後, 残余被験物質を試験委託者において分析 (平成

9年4月9日)した結果, 純度は 99.9 %で, 実験期間中被験物質は安定であったことを確認した。}

保管条件: 冷暗所 (4℃), 密栓

## 2. 指標菌株

以下の5種類の菌株を用いた。

(塩基対置換型)

*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535

*Escherichia coli* WP2uvrA

(フレームシフト型)

*Salmonella typhimurium* TA98, TA1537

指標菌株は, 国立公衆衛生院より入手 (平成6年12月19日) したものをを用いた。

## 3. 指標菌株の検査

次に示す指標菌株の遺伝的特性およびその他の諸性質に関する項目について検査し, 本来の特性を有することを確認した。

- 1) *S. typhimurium* におけるヒスチジンおよびビオチン要求性  
*E. coli* におけるトリプトファン要求性
- 2) 紫外線感受性 (*uvrA*, *uvrB*)
- 3) *S. typhimurium* におけるクリスタルバイオレット感受性 (*rfa*)
- 4) *S. typhimurium* TA100 および TA98 におけるアンピシリン耐性 (pKM101)
- 5) 自然突然変異体数
- 6) 陽性対照物質に対する反応性

## 4. 指標菌株の保存と前培養

菌液 0.8 ml にジメチルスルホキシド (DMSO, 株式会社同仁化学研究所, ロット番号 B805086, >99%) を 0.07 ml の割合で加えて -80℃以下で保存した。この保存菌株をニュートリエントブロス (Bacto nutrient broth dehydrated, Difco laboratories,



ロット番号 44077JK) 液体培地に接種し、37°Cで 12 時間振盪培養した。培養後の菌懸濁液については、分光光度計で吸光度 (OD<sub>660nm</sub>) を測定し、濁度と生菌数の換算式より 1 ml あたり 1×10<sup>9</sup> 以上の生菌数が得られていることを確認した。

生菌数 (×10<sup>9</sup>個/ml)

指標菌株	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
濃度設定試験	1.46	1.62	1.43	1.41	1.17
本試験 1 回目	1.54	1.81	1.47	1.41	1.21
2 回目	1.54	1.53	1.38	1.44	1.24
確認試験	—	—	—	1.44	1.24

## 5. S9 mix

代謝活性化法に用いた S9 mix は、ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素分画 (S9) にコファクターを加えて凍結された市販品をキッコーマン株式会社から購入し、使用した〔濃度設定試験および本試験 (1 回目) : ロット番号 FSM-358, 1997年 2月6日製造, 1997年 2月18日購入, 本試験 (2 回目) : ロット番号 FSM-356, 1996年 12月13日製造, 1997年 1月8日購入〕。凍結 S9 mix は-80°C以下で保存し、使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 ml 当たりの組成は、次のとおりである。

### S9 製造法

#### A. 使用動物

- a) 種・系統: Sprague-Dawley系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- b) 性・週齢: 雄・7週齢
- c) 体重: 186~229g (FSM-358), 190~226g (FSM-356)

#### B. 誘導法

- a) 誘導物質: phenobarbital (PB), 5,6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路: 腹腔内投与
- c) 投与方法 (投与開始日起算):
  - 1 日目-PB 30 mg/kg, 2, 3, 4 日目-PB 60 mg/kg
  - 3 日目-BF 80 mg/kg

#### C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離 (9,000×g) し、その上清を採取

S9 mix 1 ml当たりの組成

MgCl <sub>2</sub>	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADH	4	μmol
NADPH	4	μmol
ナトリウムーリン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol
S9	0.1	ml

6. 被験物質の供試液の調製

被験物質は水に可溶であることから、溶媒には蒸留水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号 K6G94）を用いた。被験物質の供試液の調製は、実験の直前に行った。溶媒を用いて最高濃度の供試液（原液）を調製し、ついで、この原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質供試液を調製した。

7. 陰性対照および陽性対照

陰性対照（溶媒対照）は、被験物質の溶媒である蒸留水を用いた。陽性対照としては、以下の既知変異原性物質を用いた。

指標菌株	直接法 (μg/プレート)	代謝活性化法 (μg/プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	SA (0.5)	2-AA (2)
WP2uvrA	AF-2 (0.04)	2-AA (10)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (1)
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 (和光純薬工業株式会社, 98%, ロット番号 PTQ1296)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社, >90%, ロット番号 KCM 2259)

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社, 90%, ロット番号 KCG5232)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Aldrich Chemical Company, 98%, ロット番号 077 21MZ)

AF-2 および 2-AA は DMSO (株式会社同仁化学研究所, ロット番号 B805086, >99%) に, SA および 9-AA は蒸留水 (株式会社大塚製薬工場, ロット番号 K6G94) に溶解した。

#### 8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6%寒天粉末 (Difco laboratories, ロット番号 42101JG) および 0.5%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に, *S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチンおよび 0.5 mM L-ヒスチジン溶液, *E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン溶液を 1/10 容加え, アミノ酸添加軟寒天培地とした。

#### 9. 濃度設定試験 (予備試験)

本試験における被験物質の適切な濃度を把握するために, 156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 6 濃度を用いて, 本試験と同様の実験方法で試験を行った。但し, 使用するプレート数は, 各濃度 2 枚とした。

#### 10. 本試験

##### 1) 濃度設定

濃度設定試験の結果に基づき, 最高濃度は 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とし, 以下公比 2 で計 6 段階の濃度を設定した。

##### 2) 実験方法

###### (1) プレインキュベーション法 (直接法)

滅菌小試験管に前培養した菌懸濁液 0.1 ml, 被験物質の供試液 0.1 ml および 100 mM ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を分注し, 37°C で 20 分間振盪培養後, 45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 ml を加え, 最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地 (テスメディア AN 培地, オリエンタル酵母工業株式会社, 濃度設定試験: ロット番号 AN790JL, 1996年10月16日製造, 1996年12月10日購入, 本試験: ロット番号 AN840KL, 1996年11月12日製造, 1997年2月18日購入, 確認試験: ロット番号 AN860KL, 1996年11月27日製造, 1997年3月7日購入) は, Vogel-Bonner E 培地 (0.2 %クエン酸・一水塩, 1 %リン酸二カリウム, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム, 0.02%硫酸マグ

ネシウム・七水塩)に1.5%寒天粉末および2%グルコースを加え、30 ml ずつ分注したものである。37°Cで48時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては上記の被験物質の供試液 0.1 ml にかわり、溶媒(蒸留水)および陽性対照物質溶液 0.1 ml を用いて同様に実施した。試験は各濃度3枚のプレートで行った。

## (2) プレインキュベーション法(代謝活性化法)

滅菌小試験管に前培養した菌懸濁液 0.1 ml, 被験物質の供試液 0.1 ml および S9 mix 0.5 ml を分注し、37°Cで20分間振盪培養後、45°Cに保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 ml を加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37°Cで48時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.1 ml にかわり、溶媒(蒸留水)および陽性対照物質溶液 0.1 ml を用いて同様に実施した。試験は各濃度3枚のプレートで行った。

## 11. 無菌試験

濃度設定試験、本試験および確認試験において、用いた溶媒、S9 mix および最高濃度の被験物質の供試液について、それぞれ 0.1 ml に 0.6%軟寒天 2 ml を加え、最少グルコース寒天平板培地に重層後、37°Cで48時間培養し、菌の生育の有無を調べた。最少グルコース寒天平板培地は、それぞれ3枚ずつ使用した。

## 12. 試験の有効性

以下の3基準をすべて満たす場合に、試験は適切な条件下で実施され、試験は有効と判定した。

- 1) 試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix に雑菌の混入がない。
- 2) 各指標菌株の陰性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における背景データの範囲内の値を示す(自然復帰変異体数)。
- 3) 各指標菌株の陽性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における背景データの範囲あるいはその近くの値を示す。

### 13. 結果の判定

結果の判定は、各濃度におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、以下の3基準をすべて満たす場合を陽性とした。

- 1) 被験物質処理群において陰性対照値の2倍以上の数の復帰変異コロニーが出現する。
- 2) 被験物質濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する（濃度依存性）。
- 3) 2回にわたる本試験の結果から、復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

なお、濃度依存性に関しては、Jonckheere Test を用いて検討した。

## 結 果

### 1. 濃度設定試験

結果は、表 1-1, 1-2 および図 1-1, 1-2, 1-3 に示した。直接法においては、TA98 および TA1537 の 5000  $\mu\text{g}$ /プレート濃度で被験物質による菌の生育阻害が認められ、また、2500  $\mu\text{g}$ /プレート濃度で陰性対照値の2倍を越える復帰変異コロニー数の増加が認められた。その他の指標菌株では生育阻害は認められず、また、いずれの濃度においても陰性対照値と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。代謝活性化法においては、すべての指標菌株とも被験物質による生育阻害は認められず、また、いずれの濃度においても陰性対照値と比較して、2倍を越える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

なお、陰性対照群では背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められ、陽性対照群として用いた AF-2, SA, 9-AA では S9 mix 非存在下で、2-AA では S9 mix 存在下でそれぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix などには雑菌の混入は認められなかった。

したがって、本試験における被験物質の処理濃度は、最高濃度を 5000  $\mu\text{g}$ /プレートとし、以下公比2で 2500, 1250, 625, 313 および 156  $\mu\text{g}$ /プレートとした。

## 2. 本試験

結果は、表 2-1, 2-2, 3-1, 3-2 および図 2-1, 2-2, 2-3, 3-1, 3-2, 3-3 に示した。1 回目および 2 回目の実験とも、直接法においては、TA1537 の 2500  $\mu\text{g}$ /プレート濃度で陰性対照値の 2 倍を越える復帰変異コロニー数の増加が認められたが、濃度依存性は明らかではなかった。その他の指標菌株における復帰変異コロニー数は、陰性対照値の 2 倍を越えるものではなかった。但し、TA98 については、2500  $\mu\text{g}$ /プレート濃度で復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。また、TA98 および TA1537 の 5000  $\mu\text{g}$ /プレート濃度では、菌の生育阻害が認められた。代謝活性化法では、いずれの菌株においても陰性対照値と比較して 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められず、被験物質による菌の生育阻害も認められなかった。

なお、陰性対照群では背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められ、陽性対照群においてはそれぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix などには雑菌の混入は認められなかった。

## 3. 確認試験

濃度設定試験および 2 回の本試験において、直接法の TA1537 の 2500  $\mu\text{g}$ /プレート濃度で復帰変異コロニー数の増加が認められたが、濃度依存性は明らかではなかった。また、TA98 において濃度設定試験では 2500  $\mu\text{g}$ /プレートで陰性対照値の 2 倍を越える復帰変異コロニー数の増加が認められたが、2 回の本試験では増加傾向を示すにとどまった。そこで、この 2 菌株について 2500  $\mu\text{g}$ /プレート濃度から抗菌性が認められた 5000  $\mu\text{g}$ /プレート濃度間に復帰変異コロニー数の増加が認められるか否か、また、明らかな濃度依存性が得られるか否かを調べる目的で、1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 および 5000  $\mu\text{g}$ /プレート濃度を設定し、直接法による確認試験を行った。

その結果、両菌株とも 3500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の濃度で菌の生育阻害が認められた。TA1537 では 2500 および 3000  $\mu\text{g}$ /プレート濃度で陰性対照値と比較して 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められ、2000~3000  $\mu\text{g}$ /プレート濃度間で濃度依存性も認められた。TA98 においては 2000~3500  $\mu\text{g}$ /プレート濃度で復帰変異コロニー数の増加

傾向は認められたものの、陰性対照値の2倍を越えるものではなかった。

なお、陰性対照では背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められ、陽性対照においては、それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、試験に用いた菌液、溶媒および被験物質の供試液などには雑菌の混入は認められなかった。

#### 4. 比変異活性<sup>9)</sup>

直接法の TA1537 で陽性値を示す復帰変異コロニー数の増加が認められたため、比変異活性値（誘発復帰変異コロニー数/mg）を求めた。

その結果は下表のとおりであり、値の一番高い 3.6/mg を本被験物質の比変異活性値とした。

	比変異活性値
本試験（1回目）	$\frac{15-7}{2.5 \text{ mg}} = 3.2/\text{mg}$
本試験（2回目）	$\frac{15-6}{2.5 \text{ mg}} = 3.6/\text{mg}$
確認試験	$\frac{13-5}{2.5 \text{ mg}} = 3.2/\text{mg}$
	$\frac{15-5}{3.0 \text{ mg}} = 3.3/\text{mg}$

（濃度設定試験は、使用したプレート数が各濃度2枚のため、比変異活性値算出の対象からはずした。）

#### 結論および参考事項

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの細菌を用いた復帰突然変異試験を実施した結果、濃度設定試験、2回の本試験および確認試験のいずれにおいても、直接法における TA1537 で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

試験の有効性については、濃度設定試験、2回の本試験および確認試験のいずれも有効であることが確認された。

したがって、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの突然変

異誘発性は陽性と判定した。また、本被験物質の比変異活性値は 3.6/mg であった。

なお、類縁化合物である（ジメチルアミノ）エチルアクリレートの変異原性についても *S. typhimurium* および *E. coli* を用いた復帰突然変異試験および CHL 細胞を用いた染色体異常試験で陽性<sup>4)</sup>と報告されており、エチルメタクリレートについては、*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験で陰性<sup>5)</sup>、L5178Y マウスリンホーマ細胞を用いた染色体異常試験で陽性<sup>6)</sup>、CHO 細胞を用いた染色体異常試験では陰性<sup>7)</sup>および姉妹染色分体交換試験で陽性<sup>7)</sup>と報告されている。また、2-(ジメチルアミノ)エチル塩化物については、麦酒酵母菌を用いた復帰突然変異試験で陽性<sup>8)</sup>と報告されている。

#### 参考文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Research*, **113**, 173-215.
- 2) Green, M.H. (1984). "Handbook of Mutagenicity Test Procedures", 1, Vol.3, eds. by Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier Science Publisher, Amsterdam, New York, Oxford, pp.161-187.
- 3) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化審法毒性試験法の解説" 改定版, 化学工業日報社, 東京, 1992, p.42.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol.5," 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1997, pp.595-604.
- 5) Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K. and Speck, W. (1987). *Salmonella* mutagenicity test : III. Results from the testing of 255 chemicals, *Environmental Mutagenesis*, **9**(supplement 9), 1-109.
- 6) Moore, M.M., Amtower, A., Doerr, C.L., Brock, K.H. and Dearfield, K.L. (1988). Genotoxicity of acrylic acid, methyl acrylate, ethyl acrylate, methyl methacrylate, and ethyl methacrylate in L5178Y mouse lymphoma cells, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **11**, 49-63.



- 7) Richardson, M.L. and Gangolli, S. (1994). "The Dictionary of Substances and their Effects," Vol.4, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 430-432.
- 8) Zimmermann, F.K., Borstel, R.C., Halle, E.S., Parry, J.M., Siebert, D., Zetterberg, G., Barale, R. and Loprieno, N. (1984). Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae* : a report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research*, **133**, 199-244.

表 1-1 S9 mix 非存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート  
の復帰突然変異試験結果〔濃度設定試験-直接法〕

濃 度 〔 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰性対照 〔蒸留水〕	132	9	11	17	5
	130 (131)	9 (9)	11 (11)	21 (19)	8 (7)
156	112	5	16	19	4
	114 (113)	9 (7)	13 (15)	14 (17)	2 (3)
313	108	8	14	18	5
	125 (117)	12 (10)	16 (15)	17 (18)	6 (6)
625	114	12	9	17	8
	134 (124)	6 (9)	18 (14)	25 (21)	8 (8)
1250	125	9	11	24	4
	130 (128)	11 (10)	12 (12)	22 (23)	7 (6)
2500	121	5	17	45	17
	129 (125)	11 (8)	16 (17)	41 (43)	12 (15)
5000	157	6	15	15*	1*
	154 (156)	9 (8)	14 (15)	14* (15)	3* (2)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu\text{g}/\text{プレート}$	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異 コロニー数 /プレート	854 (850)	322 (313)	878 (864)	417 (384)	685 (805)

( ): 平均値

\* : 菌の生育阻害が認められた

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 1-2 S9 mix 存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート  
の復帰突然変異試験結果〔濃度設定試験-代謝活性化法〕

濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔蒸留水〕	110	8	15	31	10
	131	9	16	44	14
	(121)	( 9)	(16)	(38)	(12)
156	122	11	13	30	18
	132	9	22	30	12
	(127)	(10)	(18)	(30)	(15)
313	153	11	26	41	14
	135	7	26	35	12
	(144)	( 9)	(26)	(38)	(13)
625	140	6	22	34	11
	144	14	17	30	17
	(142)	(10)	(20)	(32)	(14)
1250	150	10	19	32	10
	134	5	19	35	12
	(142)	( 8)	(19)	(34)	(11)
2500	174	13	16	44	17
	183	14	23	50	11
	(179)	(14)	(20)	(47)	(14)
5000	169	13	17	54	12
	194	8	21	65	12
	(182)	(11)	(19)	(60)	(12)
陽 性 対 照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu\text{g}/\text{プレート}$	1	2	10	1	2
復 帰 変 異 コ ロ ニ ー 数 / プ レ ー ト	450	205	922	215	77
	474	173	982	245	63
	(462)	(189)	(952)	(230)	(70)

( ): 平均値

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート  
の復帰突然変異試験結果 (本試験 1 回目-直接法)

濃 度 〔 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰性対照 〔蒸留水〕	143	11	13	17	7
	147	12	14	18	7
	163	7	20	24	6
	(151 $\pm$ 11)	(10 $\pm$ 3)	(16 $\pm$ 4)	(20 $\pm$ 4)	(7 $\pm$ 1)
156	169	8	17	18	6
	191	10	16	20	10
	169	10	15	30	3
	(176 $\pm$ 13)	(9 $\pm$ 1)	(16 $\pm$ 1)	(23 $\pm$ 6)	(6 $\pm$ 4)
313	142	9	10	16	6
	148	8	16	24	6
	171	9	14	17	4
	(154 $\pm$ 15)	(9 $\pm$ 1)	(13 $\pm$ 3)	(19 $\pm$ 4)	(5 $\pm$ 1)
625	136	11	10	26	6
	157	10	10	27	5
	150	12	12	18	7
	(148 $\pm$ 11)	(11 $\pm$ 1)	(11 $\pm$ 1)	(24 $\pm$ 5)	(6 $\pm$ 1)
1250	172	8	12	19	7
	181	10	17	17	6
	178	8	19	24	8
	(177 $\pm$ 5)	(9 $\pm$ 1)	(16 $\pm$ 4)	(20 $\pm$ 4)	(7 $\pm$ 1)
2500	164	14	11	30	11
	162	6	20	44	15
	148	9	14	30	18
	(158 $\pm$ 9)	(10 $\pm$ 4)	(15 $\pm$ 5)	(35 $\pm$ 8)	(15 $\pm$ 4)
5000	170	8	17	19*	4*
	171	8	19	46*	3*
	165	8	18	37*	6*
	(169 $\pm$ 3)	(8 $\pm$ 0)	(18 $\pm$ 1)	(34 $\pm$ 14)	(4 $\pm$ 2)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu\text{g}/\text{プレート}$	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異 コロニー数 /プレート	830	361	895	382	1014
	888	315	933	384	794
	888	320	941	402	1030
	(869 $\pm$ 33)	(332 $\pm$ 25)	(923 $\pm$ 25)	(389 $\pm$ 11)	(946 $\pm$ 132)

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-2 S9 mix 存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート  
の復帰突然変異試験結果〔本試験 1 回目-代謝活性化法〕

濃 度 〔 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔蒸留水〕	149	20	19	25	9
	150	15	14	41	16
	163	10	15	40	10
	(154 $\pm$ 8)	(15 $\pm$ 5)	(16 $\pm$ 3)	(35 $\pm$ 9)	(12 $\pm$ 4)
156	184	10	17	28	12
	174	6	14	38	8
	186	9	14	37	9
	(181 $\pm$ 6)	( 8 $\pm$ 2)	(15 $\pm$ 2)	(34 $\pm$ 6)	(10 $\pm$ 2)
313	207	16	22	32	8
	187	7	17	29	7
	192	10	15	41	18
	(195 $\pm$ 10)	(11 $\pm$ 5)	(18 $\pm$ 4)	(34 $\pm$ 6)	(11 $\pm$ 6)
625	220	9	14	39	13
	223	18	15	35	15
	193	7	21	33	13
	(212 $\pm$ 17)	(11 $\pm$ 6)	(17 $\pm$ 4)	(36 $\pm$ 3)	(14 $\pm$ 1)
1250	216	15	16	35	14
	221	14	14	42	17
	223	11	14	48	13
	(220 $\pm$ 4)	(13 $\pm$ 2)	(15 $\pm$ 1)	(42 $\pm$ 7)	(15 $\pm$ 2)
2500	222	9	20	37	18
	205	9	15	32	20
	191	12	17	41	15
	(206 $\pm$ 16)	(10 $\pm$ 2)	(17 $\pm$ 3)	(37 $\pm$ 5)	(18 $\pm$ 3)
5000	242	13	20	52	20
	214	9	17	54	17
	216	9	25	37	14
	(224 $\pm$ 16)	(10 $\pm$ 2)	(21 $\pm$ 4)	(48 $\pm$ 9)	(17 $\pm$ 3)
陽 性 対 照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu\text{g}/\text{プレート}$	1	2	10	1	2
復 帰 変 異 コ ロ ニ ー 数 / プ レ ー ト	566	205	958	301	85
	631	201	982	258	80
	510	180	988	265	103
	(569 $\pm$ 61)	(195 $\pm$ 13)	(976 $\pm$ 16)	(275 $\pm$ 23)	( 89 $\pm$ 12)

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差  
2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3-1 S9 mix 非存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート  
の復帰突然変異試験結果〔本試験 2 回目-直接法〕

濃 度 〔 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔蒸留水〕	109	13	18	21	6
	135	10	16	32	7
	141	8	17	26	5
	(128 $\pm$ 17)	(10 $\pm$ 3)	(17 $\pm$ 1)	(26 $\pm$ 6)	(6 $\pm$ 1)
156	107	13	25	26	6
	119	7	16	19	9
	103	8	15	11	6
	(110 $\pm$ 8)	(9 $\pm$ 3)	(19 $\pm$ 6)	(19 $\pm$ 8)	(7 $\pm$ 2)
313	120	7	22	29	6
	112	14	13	18	6
	151	7	20	20	10
	(128 $\pm$ 21)	(9 $\pm$ 4)	(18 $\pm$ 5)	(22 $\pm$ 6)	(7 $\pm$ 2)
625	132	16	19	27	6
	133	10	14	16	9
	130	7	18	31	6
	(132 $\pm$ 2)	(11 $\pm$ 5)	(17 $\pm$ 3)	(25 $\pm$ 8)	(7 $\pm$ 2)
1250	128	6	21	26	7
	110	11	11	15	5
	130	6	14	27	11
	(123 $\pm$ 11)	(8 $\pm$ 3)	(15 $\pm$ 5)	(23 $\pm$ 7)	(8 $\pm$ 3)
2500	121	10	17	38	18
	110	6	12	38	14
	110	11	12	42	13
	(114 $\pm$ 6)	(9 $\pm$ 3)	(14 $\pm$ 3)	(39 $\pm$ 2)	(15 $\pm$ 3)
5000	139	7	17	33*	1*
	128	13	22	54*	4*
	147	4	19	27*	2*
	(138 $\pm$ 10)	(8 $\pm$ 5)	(19 $\pm$ 3)	(38 $\pm$ 14)	(2 $\pm$ 2)
陽 性 対 照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu\text{g}/\text{プレート}$	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復 帰 変 異 コロニー数 /プレート	872	354	976	413	946
	857	340	913	432	982
	845	317	993	372	964
	(858 $\pm$ 14)	(337 $\pm$ 19)	(961 $\pm$ 42)	(406 $\pm$ 31)	(964 $\pm$ 18)

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 3-2 S9 mix 存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート  
の復帰突然変異試験結果〔本試験 2 回目-代謝活性化法〕

濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔蒸留水〕	111	11	16	30	19
	119	8	17	44	21
	136	13	17	36	18
	(122 $\pm$ 13)	(11 $\pm$ 3)	(17 $\pm$ 1)	(37 $\pm$ 7)	(19 $\pm$ 2)
156	143	14	23	29	20
	140	7	19	34	18
	139	14	13	41	16
	(141 $\pm$ 2)	(12 $\pm$ 4)	(18 $\pm$ 5)	(35 $\pm$ 6)	(18 $\pm$ 2)
313	132	11	18	48	20
	120	14	14	43	11
	139	6	17	30	22
	(130 $\pm$ 10)	(10 $\pm$ 4)	(16 $\pm$ 2)	(40 $\pm$ 9)	(18 $\pm$ 6)
625	147	16	13	39	14
	123	11	25	29	24
	142	13	14	37	20
	(137 $\pm$ 13)	(13 $\pm$ 3)	(17 $\pm$ 7)	(35 $\pm$ 5)	(19 $\pm$ 5)
1250	139	12	22	25	18
	160	8	20	44	16
	147	9	19	34	14
	(149 $\pm$ 11)	(10 $\pm$ 2)	(20 $\pm$ 2)	(34 $\pm$ 10)	(16 $\pm$ 2)
2500	133	9	17	34	16
	117	9	20	46	16
	151	11	17	40	19
	(134 $\pm$ 17)	(10 $\pm$ 1)	(18 $\pm$ 2)	(40 $\pm$ 6)	(17 $\pm$ 2)
5000	153	9	23	38	24
	175	9	20	58	27
	149	14	21	32	29
	(159 $\pm$ 14)	(11 $\pm$ 3)	(21 $\pm$ 2)	(43 $\pm$ 14)	(27 $\pm$ 3)
陽 性 対 照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu\text{g}/\text{プレート}$	1	2	10	1	2
復 帰 変 異 コロニー数 /プレート	513	197	920	351	100
	555	175	981	375	88
	637	161	971	390	82
	(568 $\pm$ 63)	(178 $\pm$ 18)	(957 $\pm$ 33)	(372 $\pm$ 20)	( 90 $\pm$ 9)

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 4 S9 mix 非存在下における 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート  
の復帰突然変異試験結果 (確認試験-直接法)

濃 度 〔 $\mu\text{g}$ /プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート					
	フレームシフト型					
	TA98			TA1537		
陰性対照 〔蒸留水〕	26	23	25	5	4	5
	(25 $\pm$ 2)			(5 $\pm$ 1)		
1000	25	23	22	8	8	5
	(23 $\pm$ 2)			(7 $\pm$ 2)		
1500	22	23	33	9	11	7
	(26 $\pm$ 6)			(9 $\pm$ 2)		
2000	33	36	30	8	7	9
	(33 $\pm$ 3)			(8 $\pm$ 1)		
2500	52	42	39	12	11	16
	(44 $\pm$ 7)			(13 $\pm$ 3)		
3000	36	47	42	13	11	21
	(42 $\pm$ 6)			(15 $\pm$ 5)		
3500	28*	29*	46*	7*	9*	6*
	(34 $\pm$ 10)			(7 $\pm$ 2)		
4000	17*	22*	16*	5*	4*	3*
	(18 $\pm$ 3)			(4 $\pm$ 1)		
4500	15*	7*	10*	3*	3*	4*
	(11 $\pm$ 4)			(3 $\pm$ 1)		
5000	10*	15*	17*	3*	8*	4*
	(14 $\pm$ 4)			(5 $\pm$ 3)		
陽性対照	AF-2			9-AA		
$\mu\text{g}$ /プレート	0.1			80		
復帰変異コロニー数 /プレート	343	393	358	933	962	905
	(365 $\pm$ 26)			(933 $\pm$ 29)		

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

9-AA: 9-アミノアクリジン



図 1-1 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの復帰突然変異試験結果—濃度設定試験

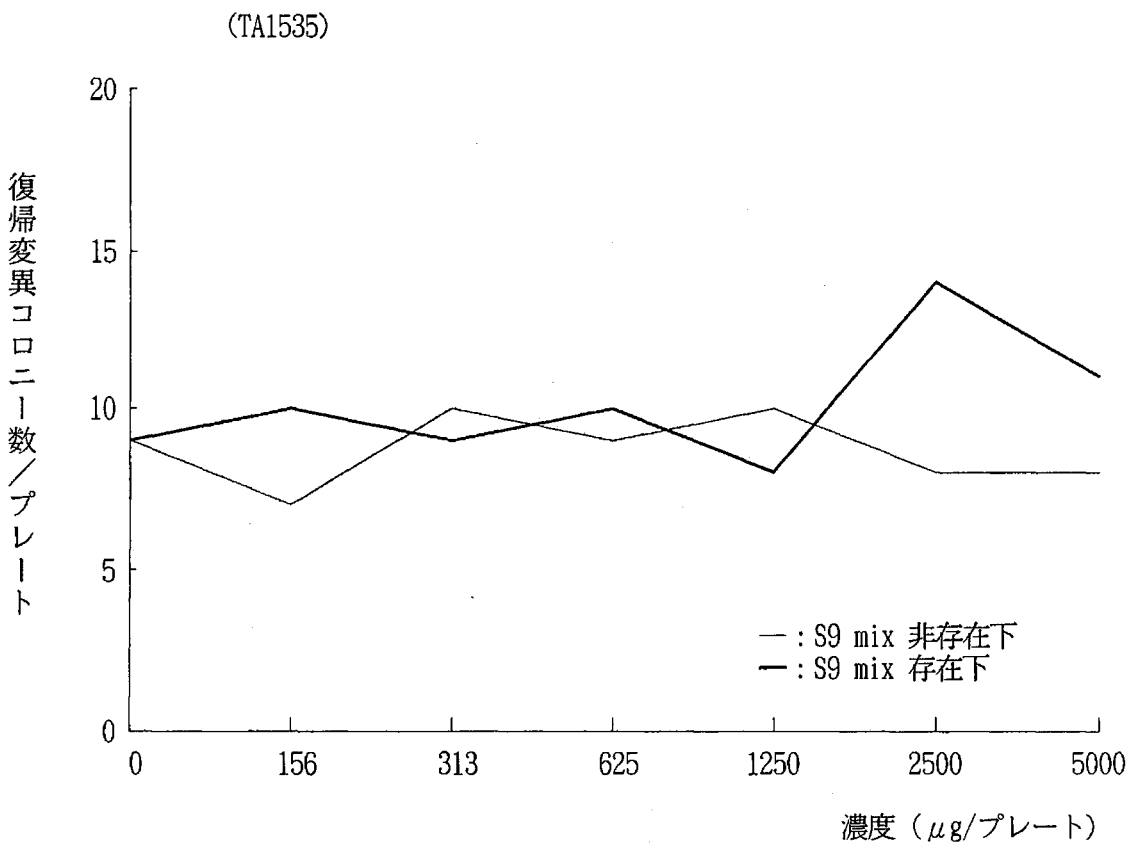
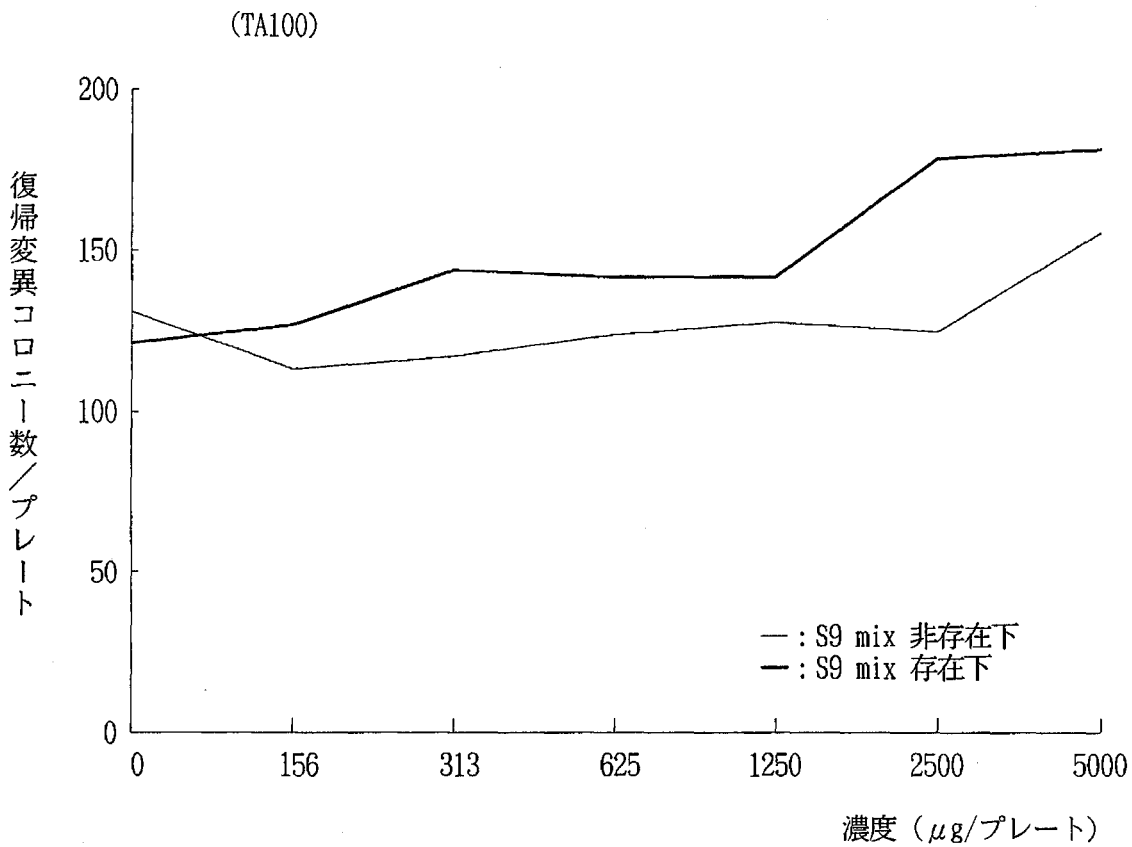


図 1-2 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート の復帰突然変異試験結果-濃度設定試験

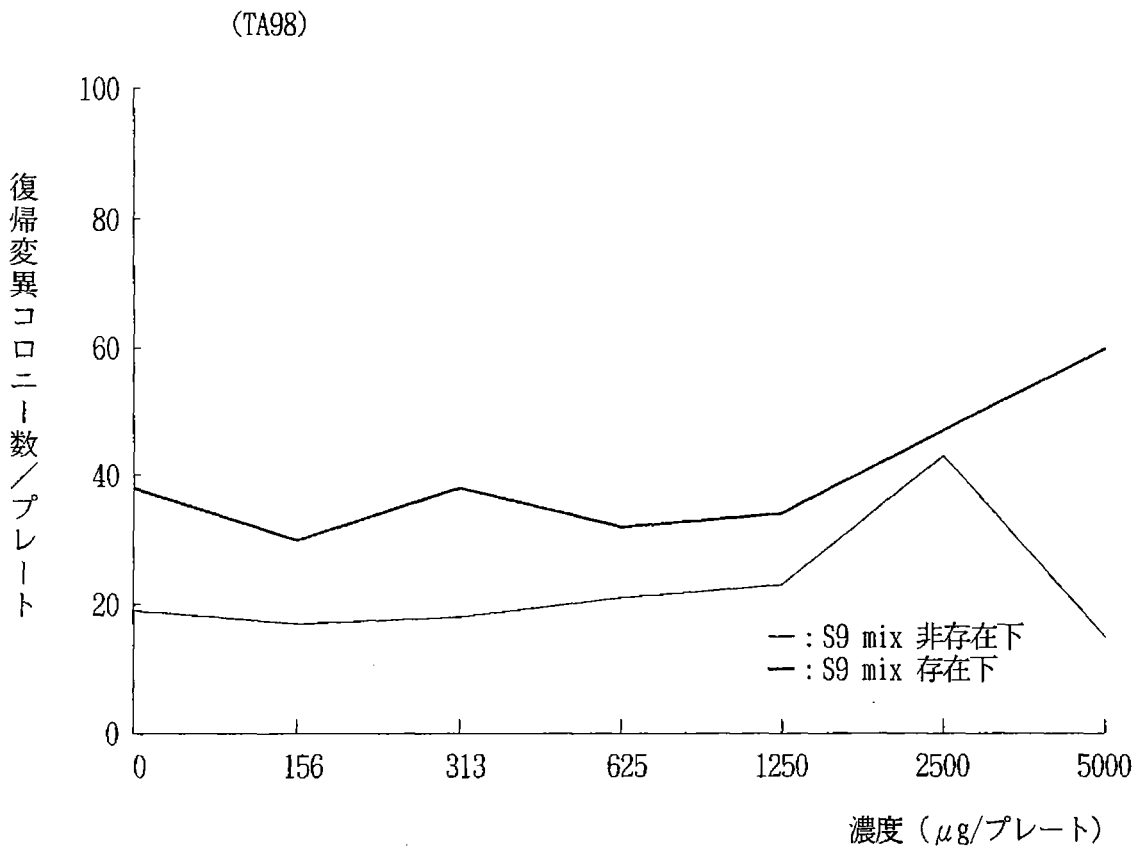
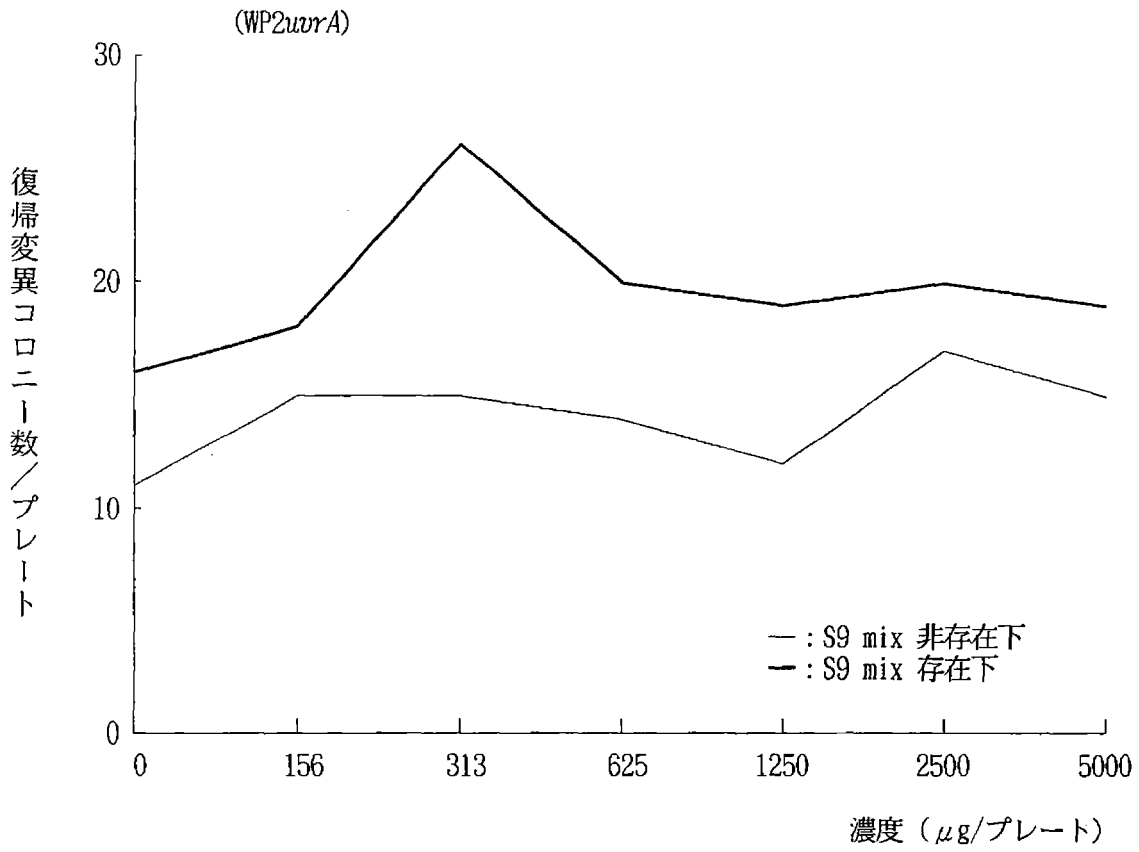


図 1-3 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの復帰突然変異試験結果-濃度設定試験

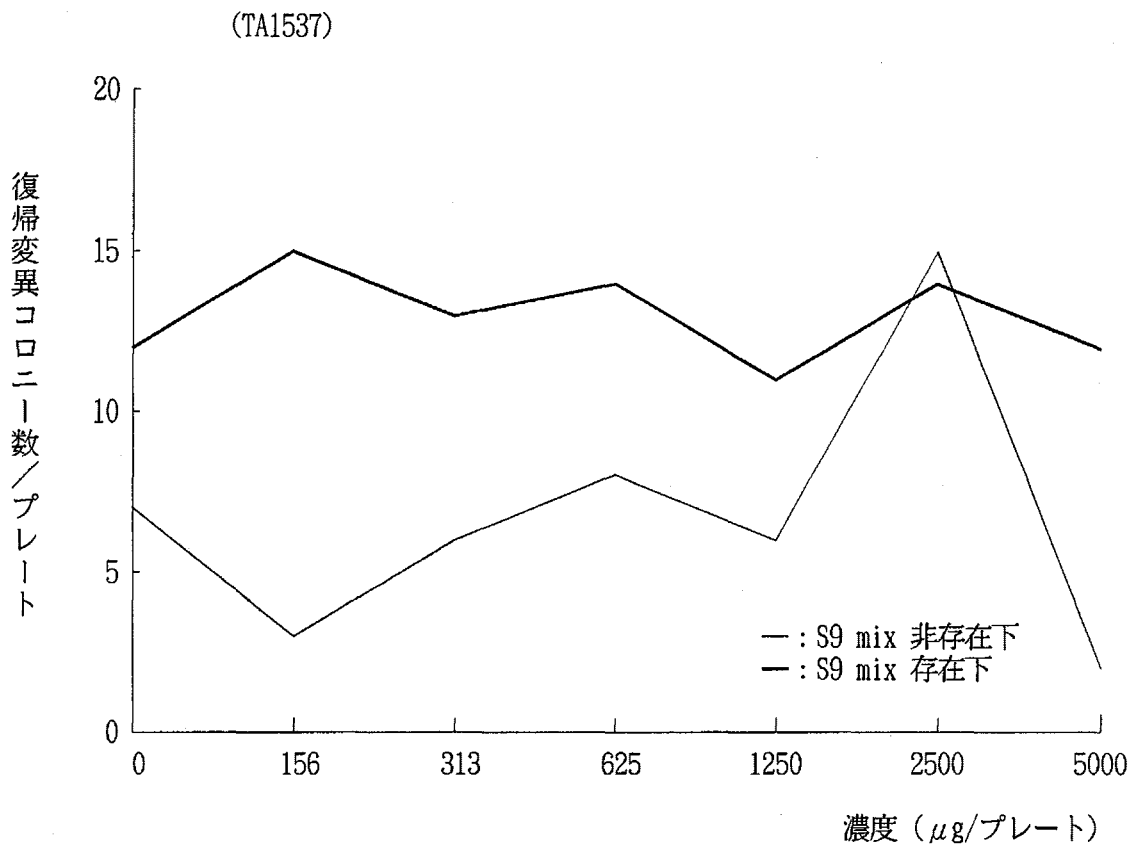


図 2-1 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

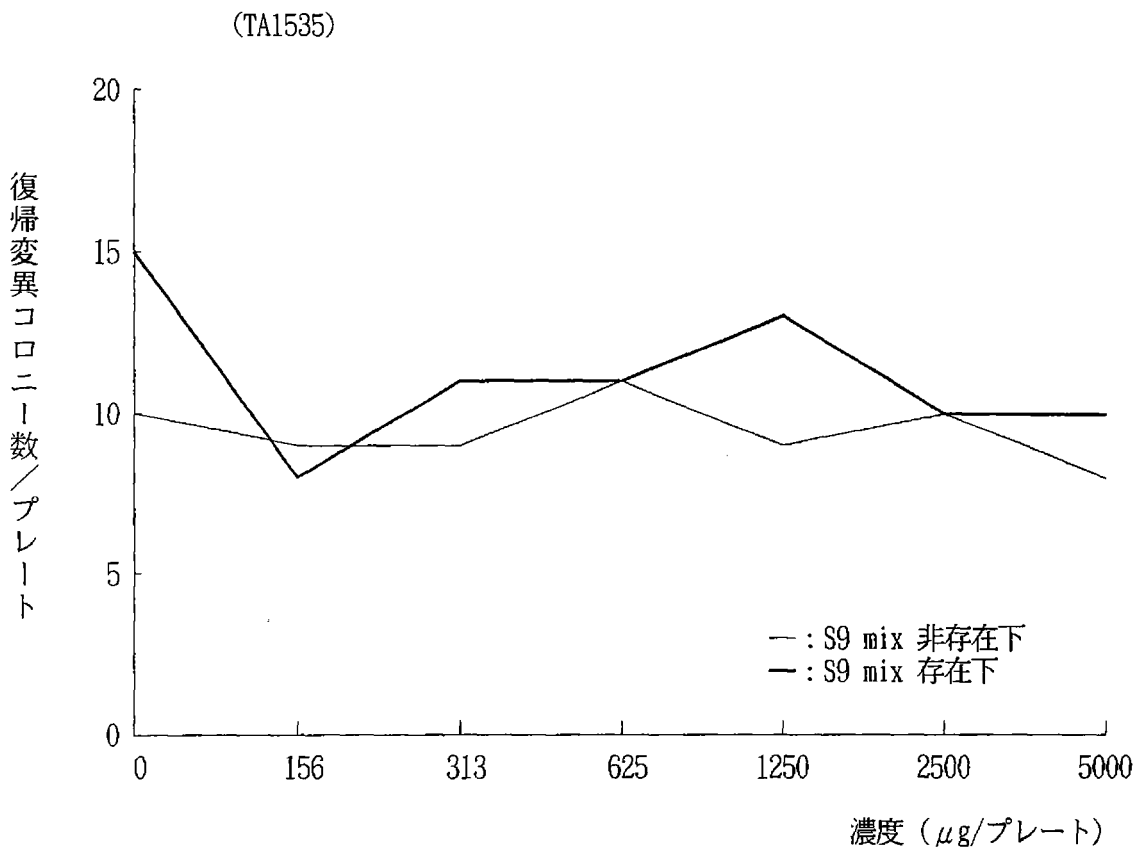
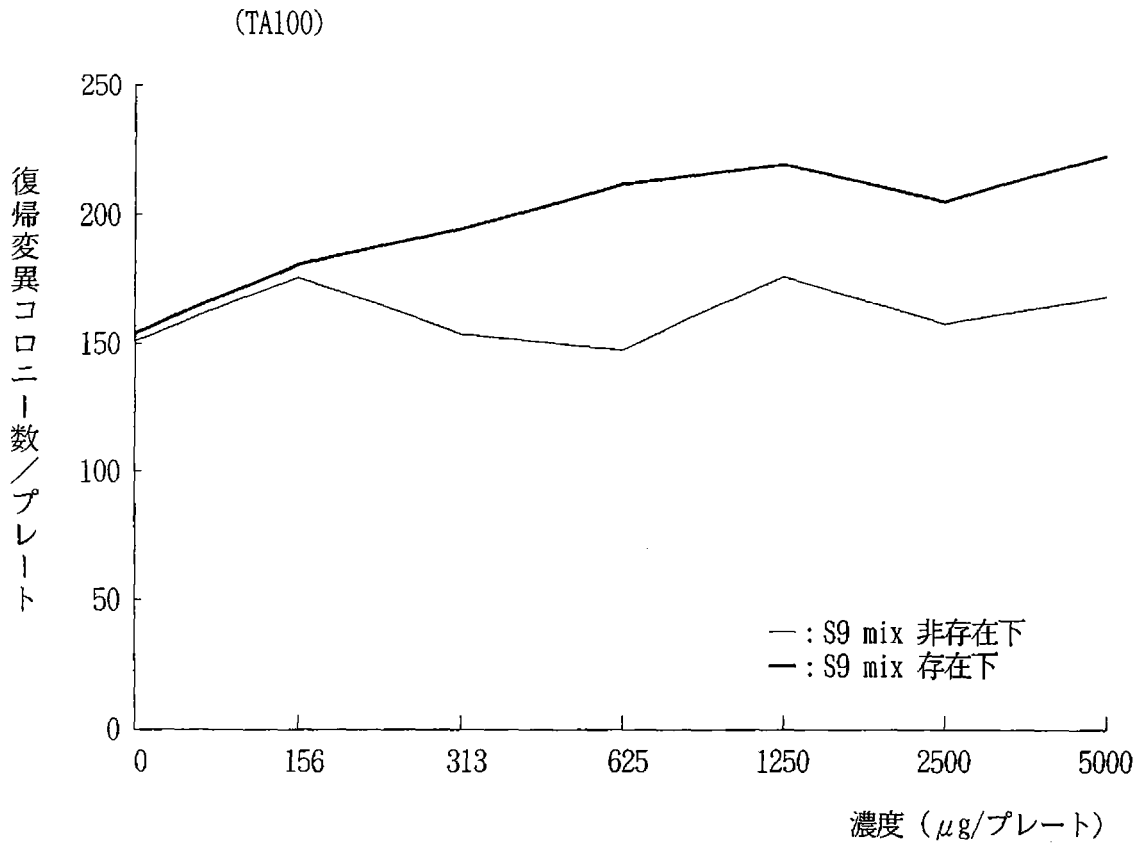


図 2-2 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

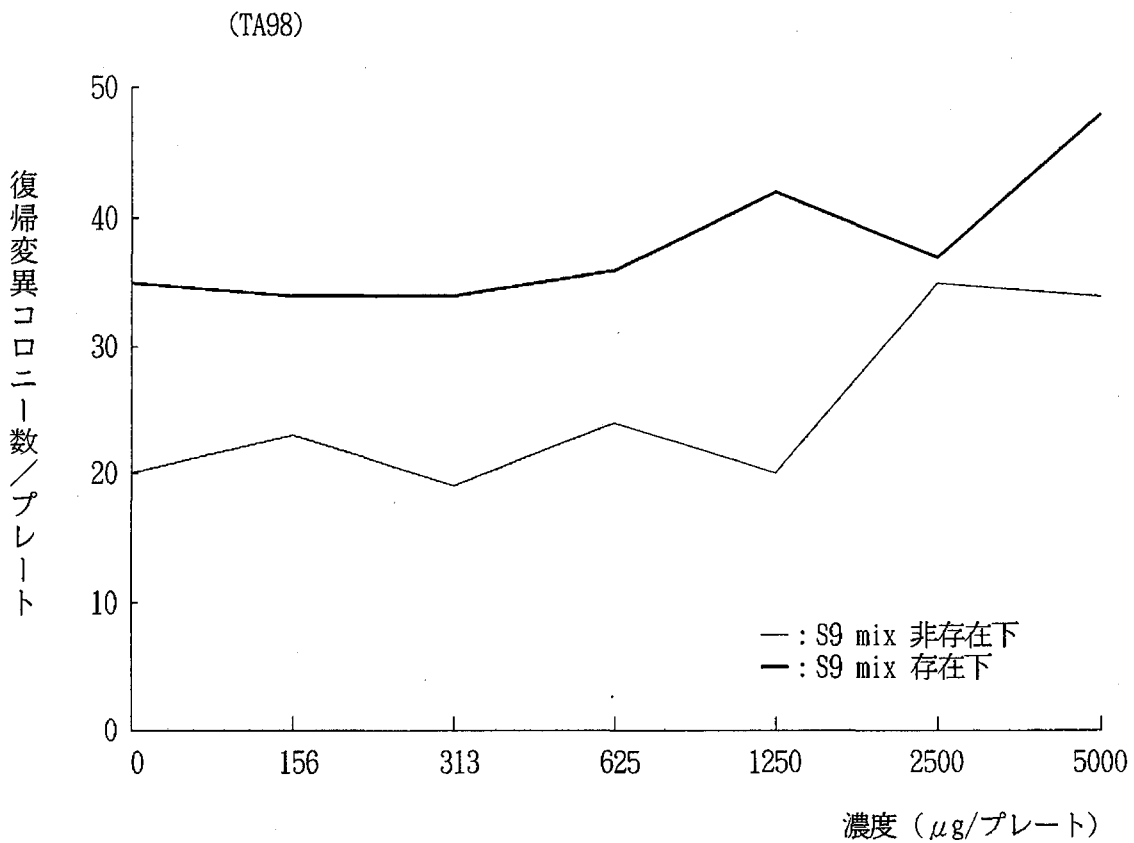
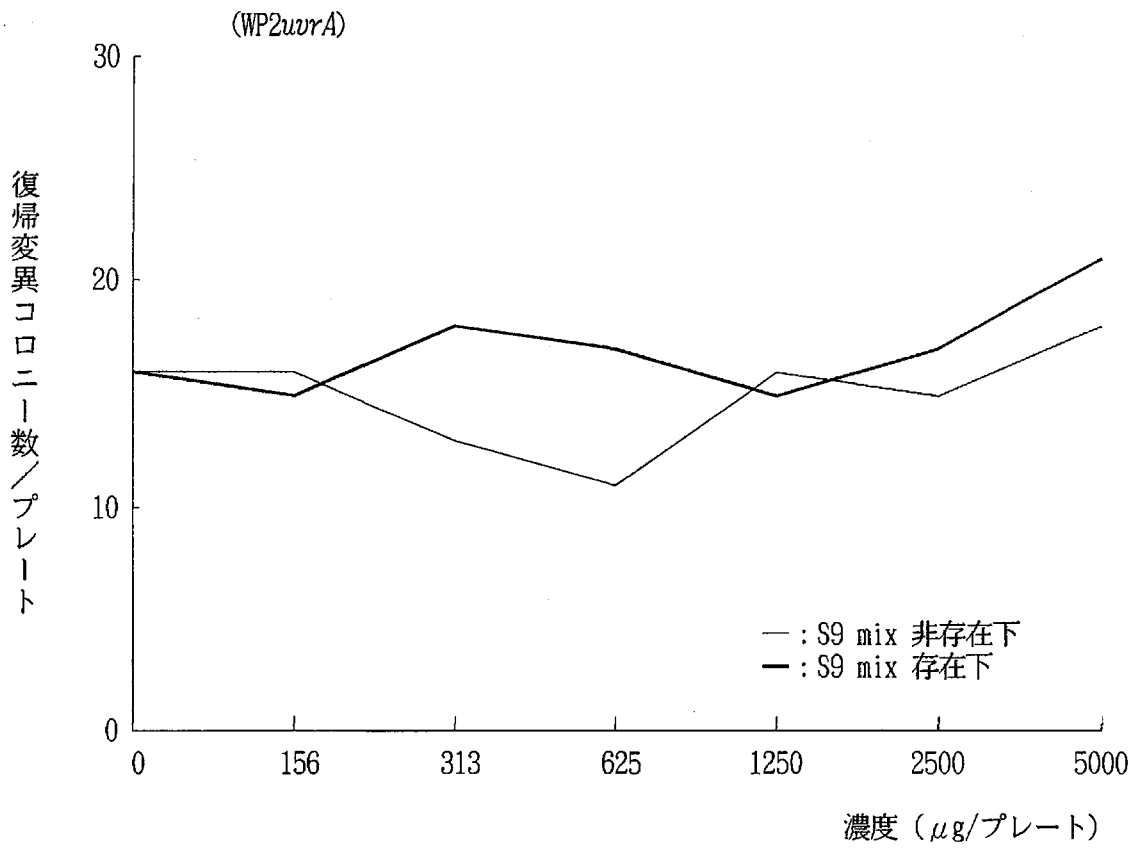


図 2-3 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの復帰突然変異試験結果-本試験1回目

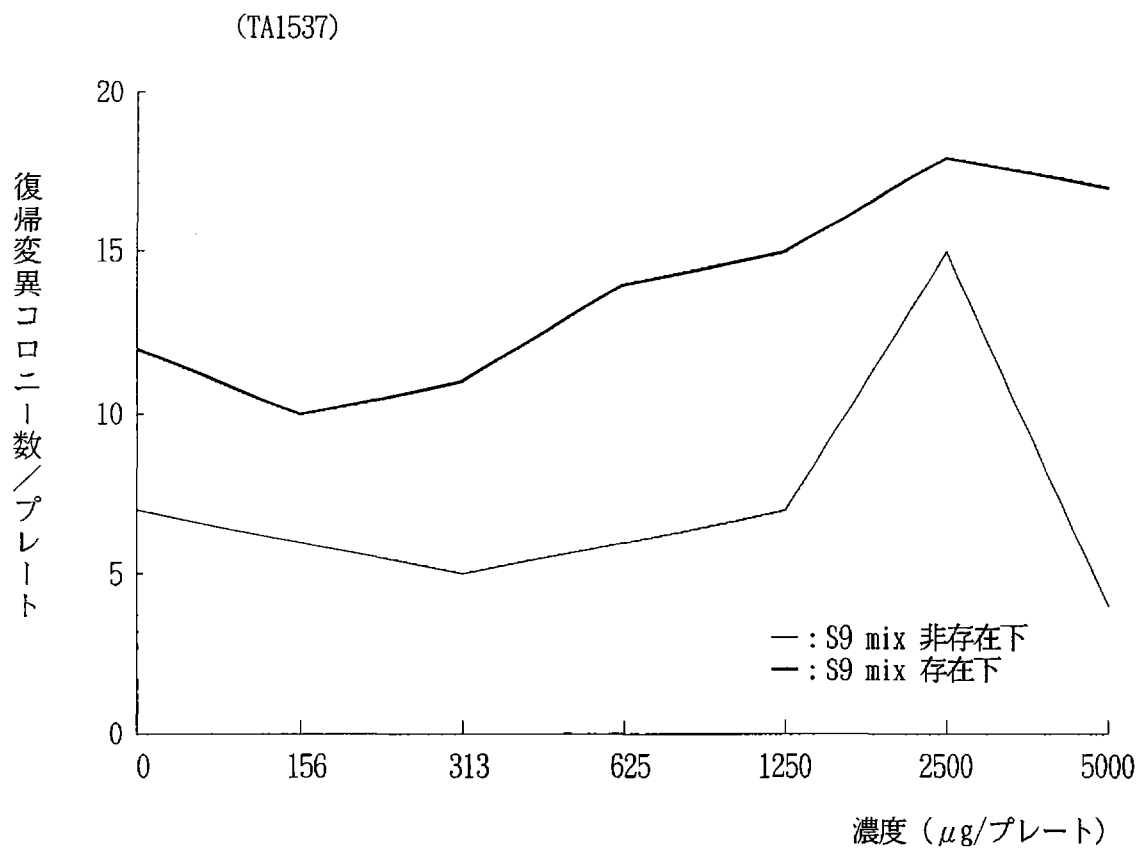


図 3-1 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

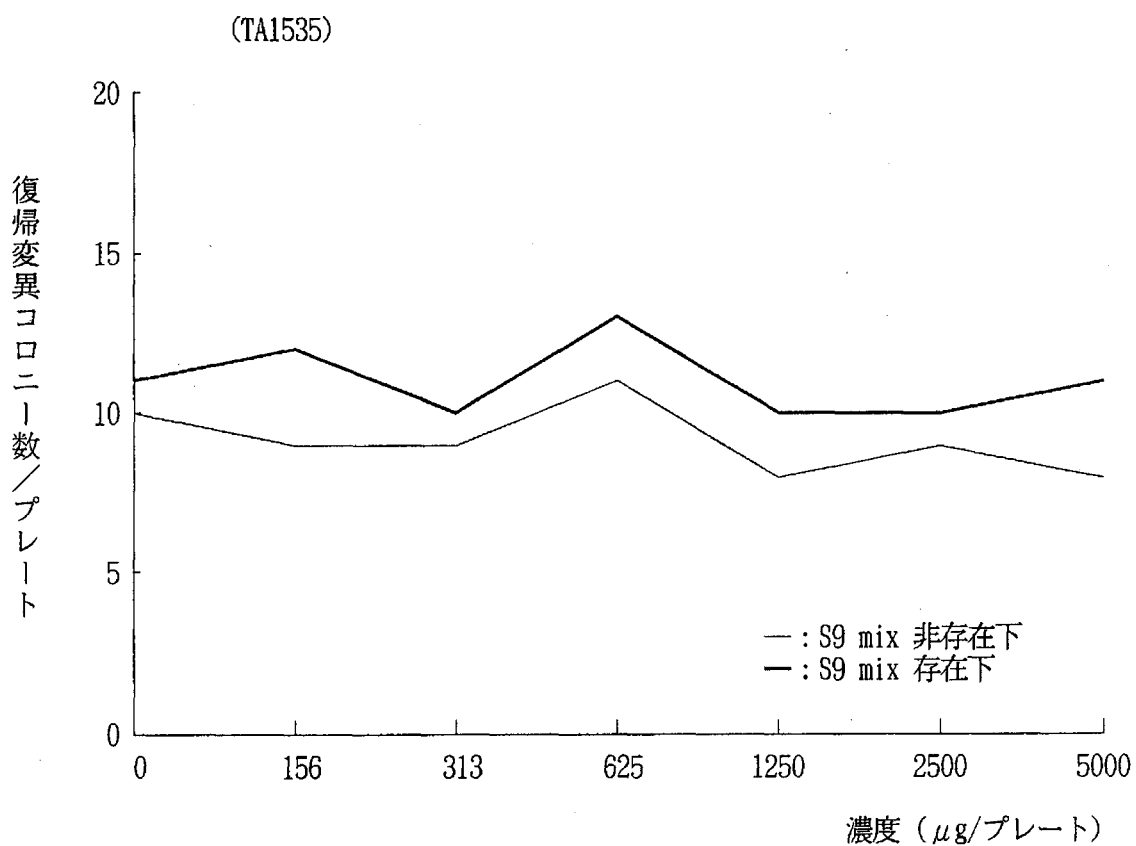
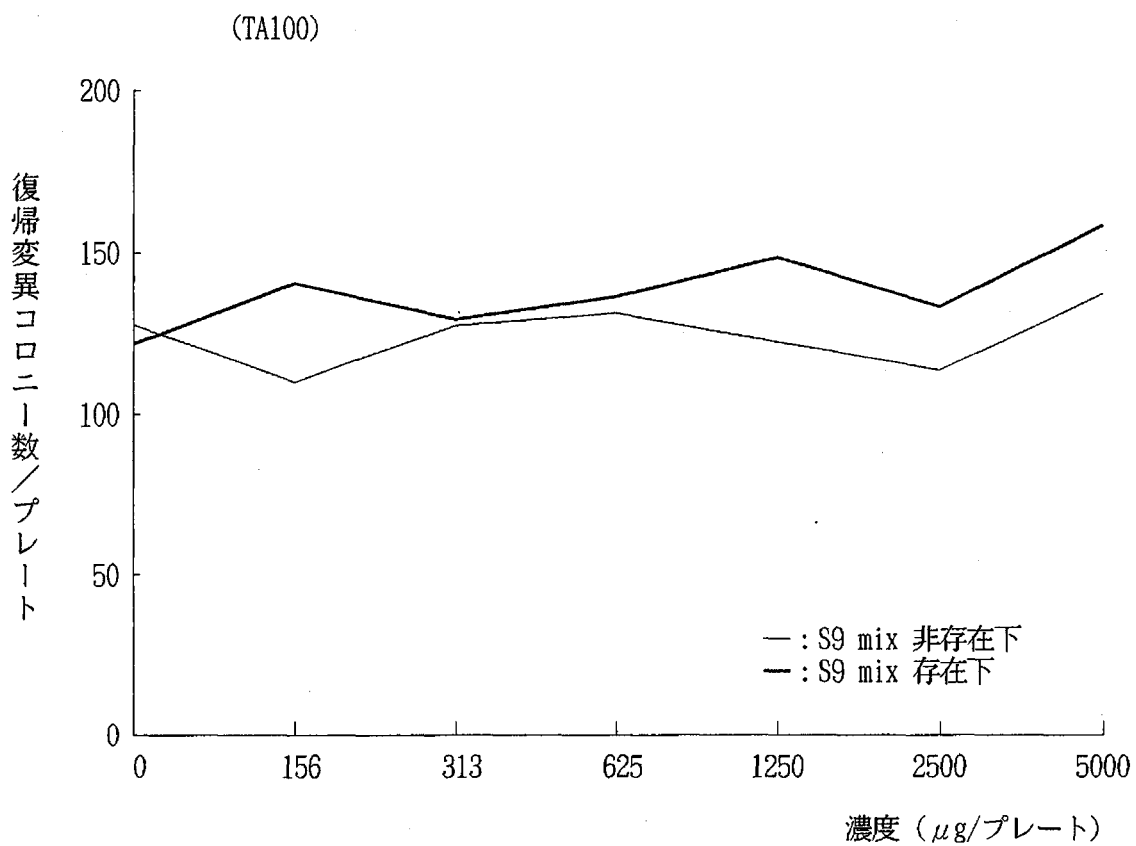


図 3-2 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの復帰突然変異試験結果-本試験2回目

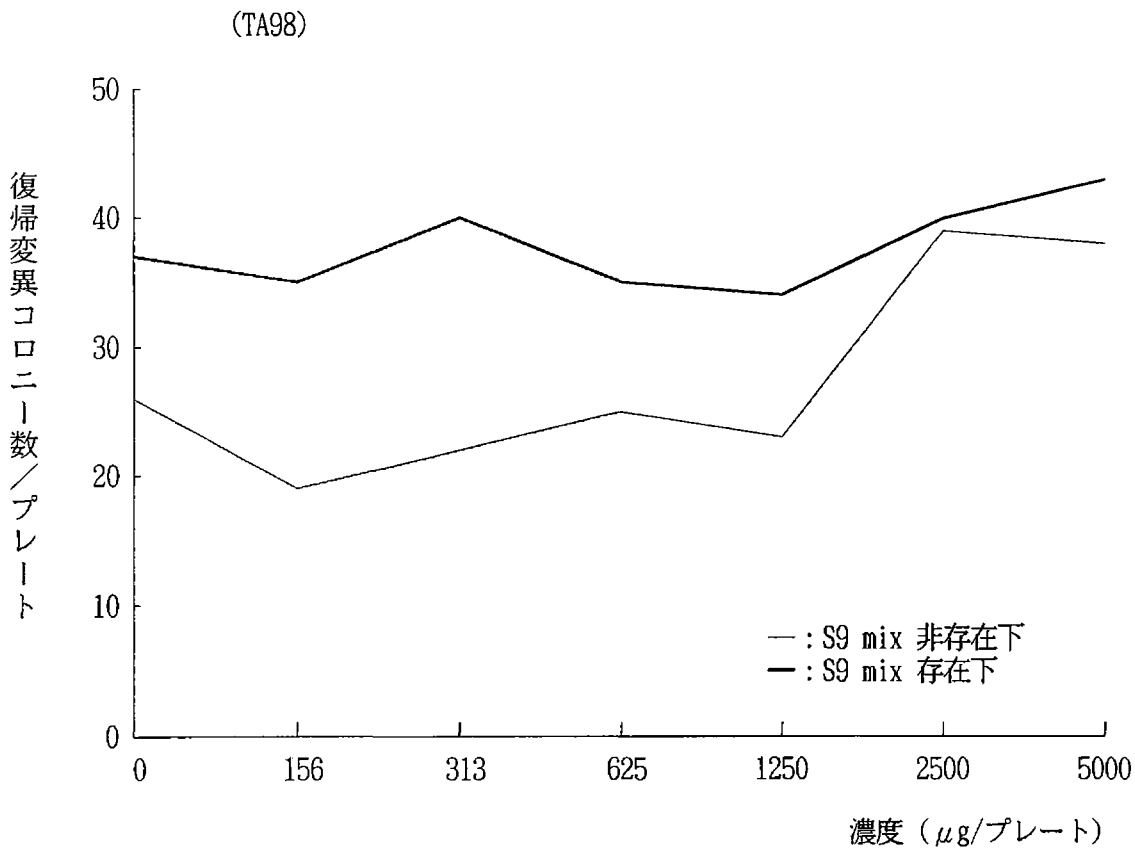
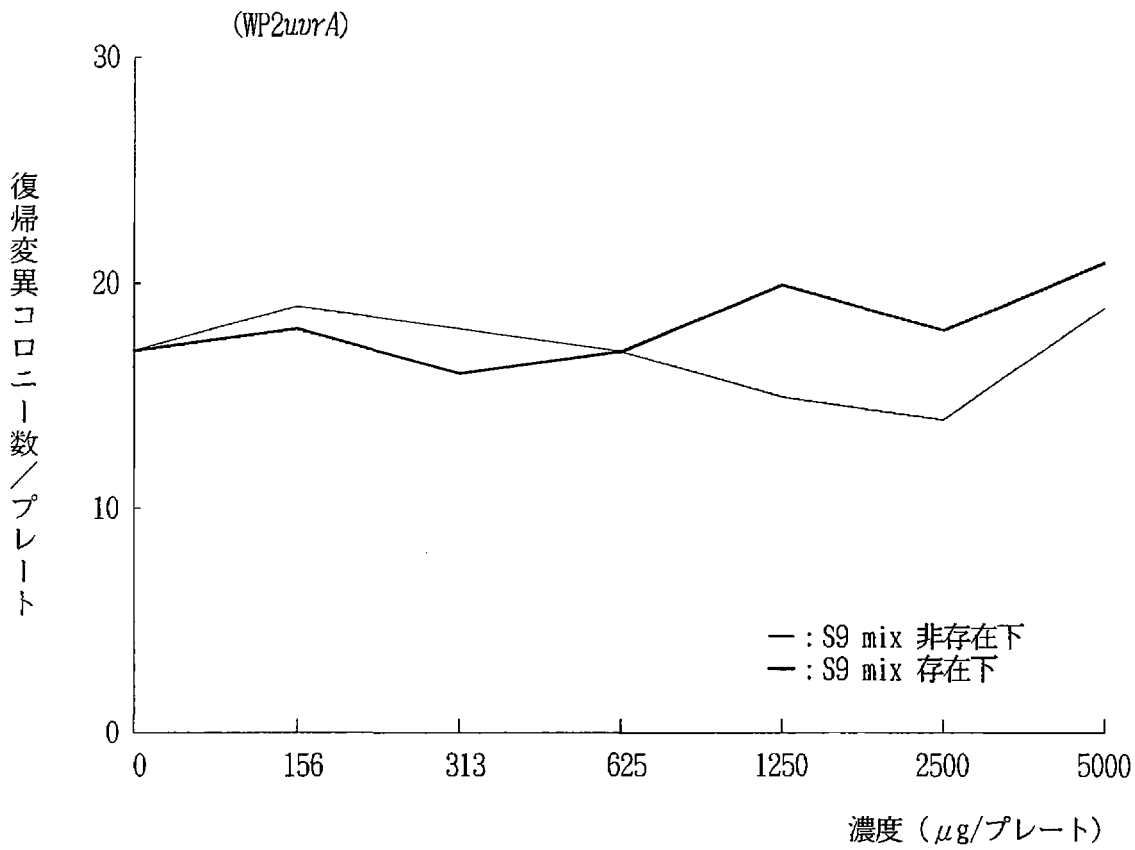




図 3-3 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

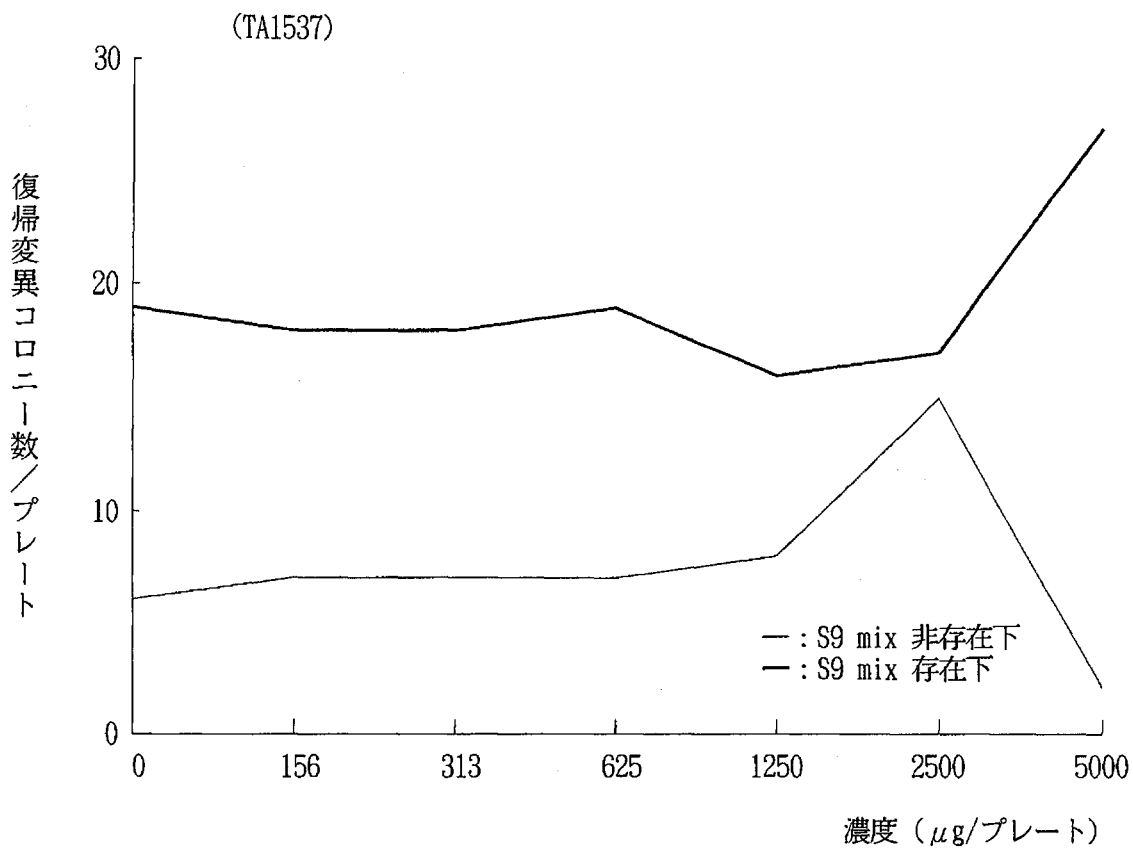


図 4 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの復帰突然変異試験結果-確認試験

