最 終 報 告 書

2, 6-ジメチルアニリンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：6871 (115－168)

平成 16 年 11 月 10 日

試験委託者
厚生労働省　医薬食品局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目　次

1. 要約 6

12. 被験物質 10
13. 試験材料および方法 12
14. 試験結果 20
15. 考察および結論 22
16. 参考文献 24

Figures		F-01~11
Figure 1	Dose-finding study with Aniline, 2,6-dimethyl- in strain TA100	F-01
Figure 2	Dose-finding study with Aniline, 2,6-dimethyl- in strain TA1535	F-02
Figure 3	Dose-finding study with Aniline, 2,6-dimethyl- in strain WP2*uvrA*	F-03
Figure 4	Dose-finding study with Aniline, 2,6-dimethyl- in strain TA98	F-04
Figure 5	Dose-finding study with Aniline, 2,6-dimethyl- in strain TA1537	F-05
Figure 6	Bacterial reversion assay of Aniline, 2,6-dimethyl- in strain TA100	F-06
Figure 7	Bacterial reversion assay of Aniline, 2,6-dimethyl- in strain TA1535	F-07
Figure 8	Bacterial reversion assay of Aniline, 2,6-dimethyl- in strain WP2*uvrA*	F-08
Figure 9	Bacterial reversion assay of Aniline, 2,6-dimethyl- in strain TA98	F-09
Figure 10	Bacterial reversion assay of Aniline, 2,6-dimethyl- in strain TA1537	F-10

Figure 11 Bacterial reversion assay (confirmative examination) of Aniline, 2,6-dimethyl- in strain TA100 F-11

Tables T-1~5

Table 1 Summary data of dose-finding study with Aniline, 2,6-dimethyl- [non-activation method : –S9] T-1

Table 2 Summary data of dose-finding study with Aniline, 2,6-dimethyl- [activation method : +S9] T-2

Table 3 Results of the bacterial reversion assay of Aniline, 2,6-dimethyl- [non-activation method : –S9] T-3

Table 4 Results of the bacterial reversion assay of Aniline, 2,6-dimethyl- [activation method : +S9] T-4

Table 5 Results of the bacterial reversion assay (confirmative examination) of Aniline, 2,6-dimethyl- [activation method : +S9] T-5

1. 要約

本試験条件下において，2, 6-ジメチルアニリンには遺伝子突然変異を誘起する作用があるものと判断した.

2, 6-ジメチルアニリンの変異原性について，遺伝子突然変異誘発性を検討するため，ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）TA100, TA98, TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌（*Escherichia coli*）WP2*uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った.

その結果，TA100 および TA1535 では，代謝活性化系存在下（+S9 mix 処理）における 2, 6-ジメチルアニリン処理群で復帰突然変異コロニー数に明確な増加が認められた．変異原性強度の相対的比較値である比活性の最大値は 232（mg 当たり）となり，非常に弱い変異原性を認めた.

その他の各菌株では，代謝活性化系存在の有無にかかわらず，陰性対照と比較し復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった.

一方，代謝活性化系非存在下（–S9 mix 処理）および代謝活性化系存在下での陽性対照物質は，それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した.

これら両試験系での試験結果は，用量設定試験，復帰突然変異試験および復帰突然変異試験（確認試験）において再現性が確認された.

12. 被験物質

試験に使用する被験物質は　　から購入した．試験責任者は当該被験物質の受領から返却までの間の管理を行った．

12.1. 被験物質名

2, 6-ジメチルアニリン（英名：Aniline, 2, 6-dimethyl-）

12.2. ロット番号

12.3. 純度

99.8%

12.4. 製造元

12.5. 保存条件

室温・遮光保存

12.6. 保存場所

安評センター被験物質保管庫（C-3）

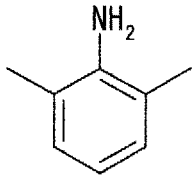
12.7. CAS No.

87-62-7

12.8. 化学名

Aniline, 2, 6-dimethyl-; 2, 6-Xylidine; 2-amino-1, 3-dimethylbenzene

12.9. 化学構造



12.10. 分子式

$C_8H_{11}N$

12.11. 分子量

121.18

12.12. 物質の状態

暗褐色澄明の液体

12.13. 残余被験物質の処理

被験物質の一部を保存した後，残りは安定性分析のため
へ返却した.

13. 試験材料および方法

13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから，試験菌株として次の5種類の菌株を使用した．

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2*uvrA*	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学

から，また，大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所）から分与を受けた．

平成14年9月30日～10月3日に菌株の特性検査を実施し，規定の特性を保持している菌株を試験に使用した．各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；Merck KGaA；純度99.9%，Lot No. K27073678）を容量比80：7の割合で添加した後，凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した．これを液体窒素を用いて凍結した後，超低温フリーザー(MDF-U71V：三洋電機バイオメディカ株式会社）に保存（-80°C）した．

13.2. 培地の調製

13.2.1. 最少グルコース寒天平板培地（プレート）

テスメディアAN培地（オリエンタル酵母工業株式会社：平成14年9月18日製造, Lot No. ANI610IR）を試験に使用した．本プレートは，Vogel-Bonner最少培地Eを含む組成の溶液30 mLを無菌的にシャーレに分注したものである．

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した.

硫酸マグネシウム・7 水塩	0.2	g
クエン酸・1 水塩	2	g
リン酸二カリウム・無水塩	10	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
グルコース	20	g
寒天（BA-30A：伊那食品工業株式会社；Lot No. 20108）	11.5	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー（軟寒天）

塩化ナトリウム 0.5 w/v%および寒天（Bacto-agar：Difco Laboratories；Lot No. 0340002）0.6 w/v%を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した後，ネズミチフス菌を用いる試験の場合，0.5 mmol/L **L**-ヒスチジン（関東化学株式会社；Lot No. 107D2017）および 0.5 mmol/L **D**-ビオチン（関東化学株式会社；Lot No. 301C2275）水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え，大腸菌を用いる試験の場合，0.5 mmol/L **L**-トリプトファン（関東化学株式会社；Lot No. 008D2026）水溶液を同じく 1 容量加えた.

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバッフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス（Nutrient Broth No. 2：Oxoid Limited；Lot No. 218041）培養液を 25 mL 分注し，これに融解した菌懸濁液を 50 μL 接種した．培養開始までの間冷却ユニット（ECS-1：東京理化器械株式会社）を用いて 4°C に保存し，その後ウォーターバスシェーカー（MM-10：タイテック株式会社）を用い，37°C で 8 時間振盪（100 回／分）培養した．試験毎に菌株の培養を実施し，菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した.

ATP フォトメーター（ルミテスター K-100：キッコーマン株式会社）を用いて計測した生菌数を以下に示した.

試験	試験生菌数（$\times 10^9$／mL）				
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
用量設定試験	4.15	3.86	4.77	2.49	2.00
復帰突然変異試験	2.98	3.52	4.08	3.00	1.43
確認試験	3.22	-	-	-	-

13.4. S9 mix

製造後 6 ヵ月以内の S9 mix（キッコーマン株式会社；Lot No. FSM-475）を試験に使用した.

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種，性，臓器，誘導物質ならびに誘導方法を以下に示した.

ロット番号	RAA-475
製造年月日	平成 14 年 12 月 6 日（誘導物質投与開始後 5 日目）
使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系
性／週齢	雄／7 週齢
体重	198～223 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および投与回数	PB： 30 mg/kg 1 回（1 日目） 60 mg/kg 3 回（2～4 日目） BF： 80 mg/kg 1 回（3 日目）
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	25.55 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

S9	0.1	mL
$MgCl_2$	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na－リン酸緩衝液（pH 7.4）	100	μmol

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に易溶であることからモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO（GC 用；Merck KGaA；純度 99.9%；Lot No. K27073678）に溶解させた.

用量設定試験では使用直前に調製原液（50.0 mg/mL）を準備した. この 50.0 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し 16.67, 5.56, 1.85, 0.617, 0.206, 0.0686 および 0.0229 mg/mL 液を調製した後, 速やかに処理を行った.

復帰突然変異試験の場合, 使用直前に調製原液（50.0 mg/mL）を準備した. この 50.0 mg/mL 原液を DMSO で順次希釈し 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781 および 0.391 mg/mL 溶液を調製した後, 速やかに処理を行った.

復帰突然変異試験（確認試験）の場合, 使用直前に調製原液（13.0 mg/mL）を準備した. 調製原液を使用溶媒で順次希釈し 10.4, 8.32, 6.66, 5.32, 4.26, 3.41 および 2.73 mg/mL 液を調製した後, 速やかに処理を行った.

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒（DMSO）で試験した.

13.6.2. 陽性対照

調製済み陽性対照コントロール（オリエンタル酵母工業株式会社；ポジコン AM：Lot No. M0001）を試験に使用した. 購入後, 冷凍保存（–20°C）したものを用時解凍して試験に使用した. 陽性対照物質名, 使用溶媒および用量を以下に示した.

	陽性対照物質名	使用溶媒
AF-2：	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド	DMSO
NaN_3：	アジ化ナトリウム	注射用水
9-AA：	9-アミノアクリジン塩酸塩	DMSO
2-AA：	2-アミノアントラセン	DMSO

《代謝活性化系非存在下：–S9 mix》

物質	用量（μg／プレート）	濃度（μg/mL）	菌株
AF-2	0.01	0.1	ネズミチフス菌：TA100
AF-2	0.1	1.0	ネズミチフス菌：TA98
NaN_3	0.5	5.0	ネズミチフス菌：TA1535
9-AA	80	800	ネズミチフス菌：TA1537
AF-2	0.01	0.1	大腸菌：WP2*uvrA*

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

物質	用量（μg／プレート）	濃度（μg/mL）	菌株
2-AA	1	10	ネズミチフス菌：TA100
2-AA	0.5	5.0	ネズミチフス菌：TA98
2-AA	2	20	ネズミチフス菌：TA1535
2-AA	2	20	ネズミチフス菌：TA1537
2-AA	10	100	大腸菌：WP2*uvrA*

なお，これらの試験用量は旧労働省安全衛生部化学物質調査課編「安衛法における変異原性試験－テストガイドラインと GLP」に準じて設定した．

13.6.3. 無菌試験

被験物質液（調製原液）ならびに S9 mix について無菌試験を実施した．すなわち，調製原液 100 μL あるいは S9 mix 500 μL にトップアガーをそれぞれ 2 mL 添加し，プレート上に注いだ．37℃ の条件で 48 時間培養した後，

雑菌汚染の有無を確認した.

調製原液およびS9 mixのいずれについても2枚のプレートを用いて無菌試験を実施した.

2, 6-ジメチルアニリン調製原液ならびにS9 mixの無菌試験において，菌の増殖は認められなかった.

13.7. 用量設定試験（予備試験）

13.7.1. 試験用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 μg／プレートを最高用量とし，以下1667，556，185，61.7，20.6，6.86および2.29 μg／プレートの8用量を設定した.

13.7.2. 使用プレート数および識別

用量当たり3枚のプレートを用いた.

試験菌株の別，S9 mixの有無および試験用量を明記することにより各プレートを識別した.

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

試験管に使用溶媒，被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μL，次いで代謝活性化系非存在下（–S9 mix）の場合，0.1 mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.4）を500 μL，代謝活性化系存在下（+S9 mix）の場合，S9 mixを500 μL分注した．さらに前培養した試験菌株の懸濁液100 μLを加えた後，ウォーターバスシェーカー（M-100^{N}：タイテック株式会社）を用いて37°Cで20分間振盪（120回／分；プレインキュベーション）した．振盪終了後，トップアガーを2 mL添加し，内容物を混合した．その後，混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた．恒温器（SSV-R11DA：株式会社池田理化）を用いて37°Cの条件で48時間各プレートを培養した.

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において処理開始およびコロニー数計測時に析出等の有無を肉眼で観察した.

13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため，プレート上の試験菌株（背景菌）の生育状態について実体顕微鏡（× 60）を用いて観察した．次いで，復帰突然変異により生じたコロニーを計測した．計測に際しては，コロニーアナライザー（CA-11：システムサイエンス株式会社）を用い，面積補正な

らびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した.

生育阻害により，コロニーアナライザーの使用が不適当な場合，目視で計数した.

13.8. 復帰突然変異試験（本試験）

13.8.1. 試験用量

用量設定試験の結果，変異原性が疑われた代謝活性化系存在下（+S9 mix）の TA100 および TA1535 においては，正確な用量反応曲線が求められる用量で，それ以外については生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量とし以下に示した 6～7 用量を設定した.

《代謝活性化系非存在下：–S9 mix》

菌株	試験用量（μg／プレート）							
TA100	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500	
TA1535			156	313	625	1250	2500	5000
WP2*uvrA*			156	313	625	1250	2500	5000
TA98			156	313	625	1250	2500	5000
TA1537			156	313	625	1250	2500	5000

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

菌株	試験用量（μg／プレート）							
TA100	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500	
TA1535	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500	
WP2*uvrA*			156	313	625	1250	2500	5000
TA98			156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500	

13.8.2. 使用プレート数および識別

13.7.2.に準じた.

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

13.7.3.に準じた.

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に準じた.

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に準じた.

13.9. 復帰突然変異試験（確認試験）

13.9.1. 試験用量

代謝活性化系存在下（+S9 mix）TA100 において用量設定試験では，陰性対照の 2 倍以上に復帰変異コロニー数が増加したが，復帰突然変異試験では 2 倍以上の増加を示す用量が得られなかった．したがって，用量設定試験および復帰突然変異試験の結果から，以下に示した 8 用量を設定した.

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

菌株	試験用量（μg／プレート）							
TA100	273	341	426	532	666	832	1040	1300

13.9.2. 使用プレート数および識別

13.7.2.に準じた.

13.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

13.7.3.に準じた.

13.9.4. 析出等の観察

13.7.4.に準じた.

13.9.5. コロニー数計測

13.7.5.に準じた.

13.10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照の 2 倍以上に増加し，かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した.

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった．なお，陽性と判定した場合には，変異原性の強さの相対的比較値である比活性を下式で求めた．比活性値の計算において，コロニー数の平均値は四捨五入する以前の値を用いた.

$$\frac{(\text{当該濃度におけるプレート当たりのコロニー数}) - (\text{陰性対照のプレート当たりのコロニー数})}{\text{当該濃度値（mg/プレート）}}$$

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1～5 および Table 1，2 に示した.

2, 6-ジメチルアニリン処理により, 代謝活性化系存在下 TA100 の 556 μg／プレートおよび TA1535 の 1667 μg／プレートで，それぞれ陰性対照の 2.38 倍および 3.70 倍の復帰突然変異コロニーが観察され，用量相関性も認められた．その他の各試験菌株ではいずれの用量においても陰性対照と同等の値であり，増加傾向は認められなかった．また，すべての試験系において試験菌株に対する生育阻害作用が 1667～5000 μg／プレート付近で観察された.

一方，陽性対照物質はそれぞれの菌株において，陰性対照の 2 倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した.

14.2. 被験物質の析出等（用量設定試験）

被験物質処理時およびコロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

14.3. 復帰突然変異試験

試験結果を Figure 6～10 および Table 3，4 に示した.

被験物質処理群の場合, 代謝活性化系存在下 TA1535 の 1250 μg／プレートで，陰性対照の 3.03 倍の復帰突然変異コロニーが観察され，用量相関性も認められた. なお, TA100 の代謝活性化系存在下で復帰突然変異コロニー数の増加傾向が用量設定試験と同様に認められたが，陽性判定基準である陰性対照の 2 倍を超えるものではなかった. その他の各試験菌株ではいずれの用量においても陰性対照と同等の値であり，増加傾向は認められなかった．各試験菌株のいずれの処理群においても，試験菌株に対する生育阻害作用が高用量群で観察された.

一方，陽性対照物質は各試験菌株に対し，復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.4. 被験物質の析出等（復帰突然変異試験）

被験物質処理時およびコロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

14.5. 復帰突然変異試験（確認試験）

試験結果を Figure 11 および Table 5 に示した.

被験物質処理群の場合，代謝活性化系存在下 TA100 の 1040 μg／プレートで，陰性対照の 2.09 倍の復帰突然変異コロニーが観察され，用量相関性も認められた．なお，試験菌株に対する生育阻害作用は，高用量群で観察された.

一方，陽性対照物質は試験菌株に対し，復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.6. 被験物質の析出等（確認試験）

被験物質処理時およびコロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

以上，用量設定試験，復帰突然変異試験および復帰突然変異試験（確認試験）において，代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下の両試験系とも再現性が確認された.

14.7. 比活性

前述の結果から，変異原性強度の相対的比較値である比活性（mg 当たり）は以下の通り算出された.

試験	S9	菌株	試験用量	比活性
用量設定試験	+	TA100	556 μg／プレート	232
	+	TA1535	556 μg／プレート	31
	+	TA1535	1667 μg／プレート	15
復帰突然変異試験	+	TA1535	625 μg／プレート	28
	+	TA1535	1250 μg／プレート	16
	+	TA1535	2500 μg／プレート	4
確認試験	+	TA100	1040 μg／プレート	126

15. 考察および結論

2, 6-ジメチルアニリンの変異原性，すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため，細菌（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した.

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 μg／プレートあるいは試験菌株に対して生育阻害作用を示す用量まで検討した.

その結果，TA100 および TA1535 では，代謝活性化系存在下における 2, 6-ジメチルアニリン処理群で復帰突然変異コロニー数に明確な増加が認められた．変異原性強度の相対的比較値である比活性の最大値は，232（mg 当たり）と計算され，非常に弱い変異原性を認めた.

その他の各菌株では，代謝活性化系存在の有無にかかわらず，陰性対照と比較し復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった．これら両試験系での試験結果は，用量設定試験，復帰突然変異試験および復帰突然変異試験（確認試験）において再現性が確認された.

また，本被験物質 2, 6-ジメチルアニリン（Aniline, 2, 6-dimethyl-）についてマウスを用いた小核試験で陰性[1, 2]，ラットあるいはマウスを用いたUDS試験で陰性[3]との報告があった．また，ラットを用いた^{32}P－ポストラベル試験で，DNA付加体の形成が確認され[4]，BALB/c-3T3 細胞を用いたトランスフォーメーション試験で陽性との報告[5]があった．さらにNTPデータでは，本被験物質がラット（雌雄）の 2 年間発がん試験（混餌）で，鼻腔に明確な腫瘍の形成を誘発することが示され[6]，また，遺伝毒性に関してはAmes試験では陰性もしくは弱い陽性，染色体異常試験では陽性，SCE試験では陽性，ショウジョウバエを用いた優性致死試験では陰性結果が示されていた[7]．また，鼻腔に発がん性を示すことから，国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部のグループ（鈴木ら）がトランスジェニックマウスを用いて突然変異を検討したところ，鼻腔細胞でのみ突然変異の蓄積を認めている（データ未発表）．なお，本被験物質の代謝物であるN-ヒドロキシ-2, 6-ジメチルアニリンについてAmes試験で陽性[8]との報告があった.

類縁体である 2, 3-ジメチルアニリン，2, 4-ジメチルアニリンおよび 2, 5-ジメチルアニリンについてAmes試験で陽性[9]との報告があった.

なお，陰性対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数は，いずれも当施設での背景データ（Appendix 1）の範囲内であり，本試験は適切な条件でなされたと判断された.

以上の試験結果から，本試験条件下において2, 6-ジメチルアニリンの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定した.

16. 参考文献

1) Parton JW, Probst GS, Garriott ML. Mutat Res 1988; 206: 281-3.
2) Parton JW, Beyers JE, Garriott ML, Tamura RN. Mutat Res 1990; 234: 165-8.
3) Mirsalis JC, Tyson CK, Steinmetz KL, Loh EK, Hamilton CM, Bakke JP, Spalding JW. Environ Mol Mutagen 1989; 14: 155-64.
4) Jeffrey AM, Luo FQ, Amin S, Krzeminski J, Zech K, Williams GM. Drug Chem Toxicol 2002; 25: 93-107.
5) Matthews EJ, Spalding JW, Tennant RW. Environ Health Perspect 101 Suppl 2 1993; 319-45.
6) National Toxicology Program. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser. 1990; 278: 1-138.
7) National Toxicology Program. 2,6-XYLIDINE. Available from URL: http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=071A7019-D98F-0BEA-F9A168FA705384FF
8) Matilde Marques M, Gamboa da Costa G, Blankenship LR, Culp SJ, Beland FA. Mutat Res 2002; 506-507: 41-8.
9) Zimmer D, Mazurek J, Petzold G, Bhuyan BK. Mutat Res 1980; 77: 317-26.

Exp. No. 6871 (115-168)

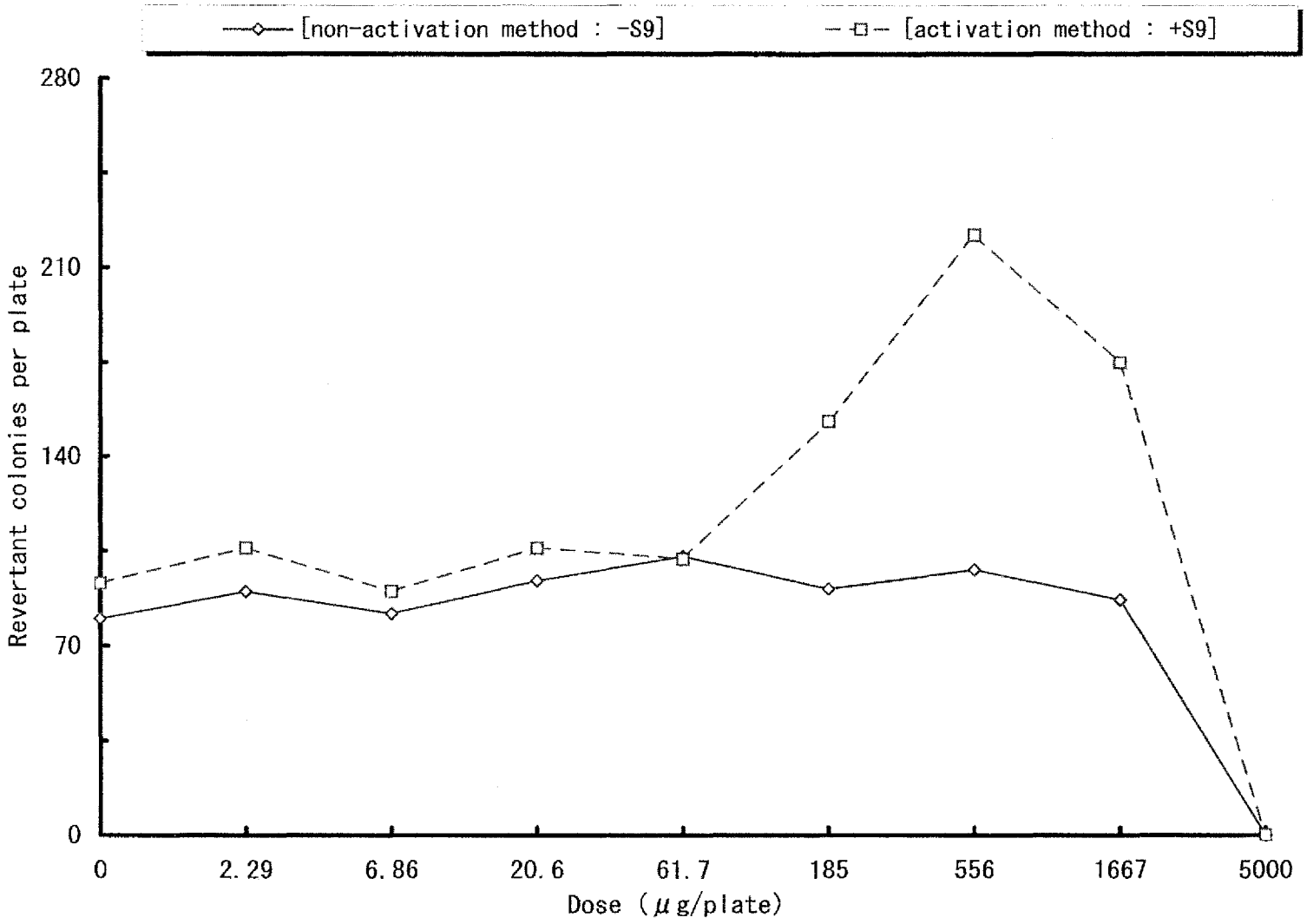


Figure 1. Dose-finding study with Aniline, 2, 6-dimethyl- in strain TA100

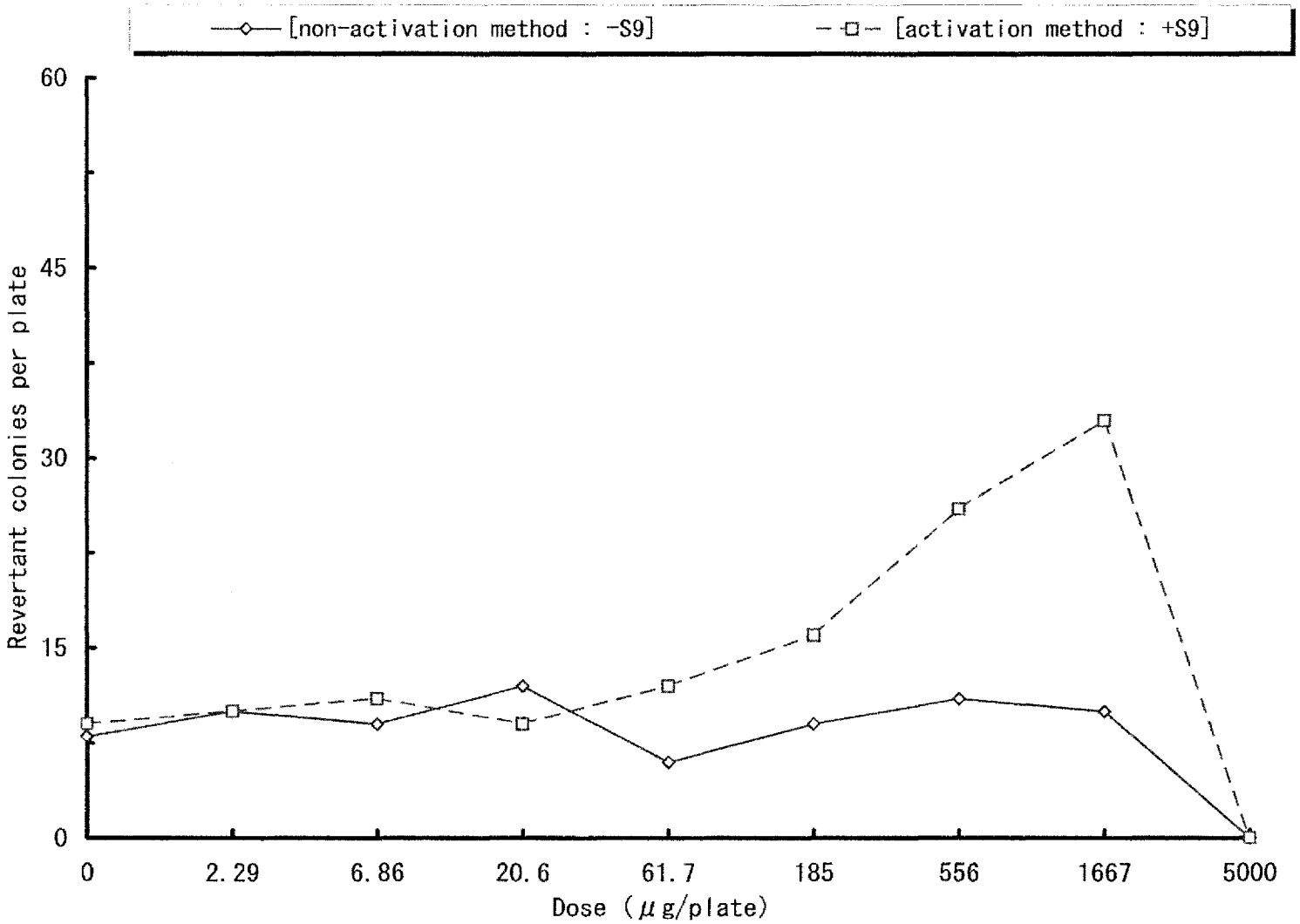


Figure 2. Dose-finding study with Aniline, 2, 6-dimethyl- in strain TA1535

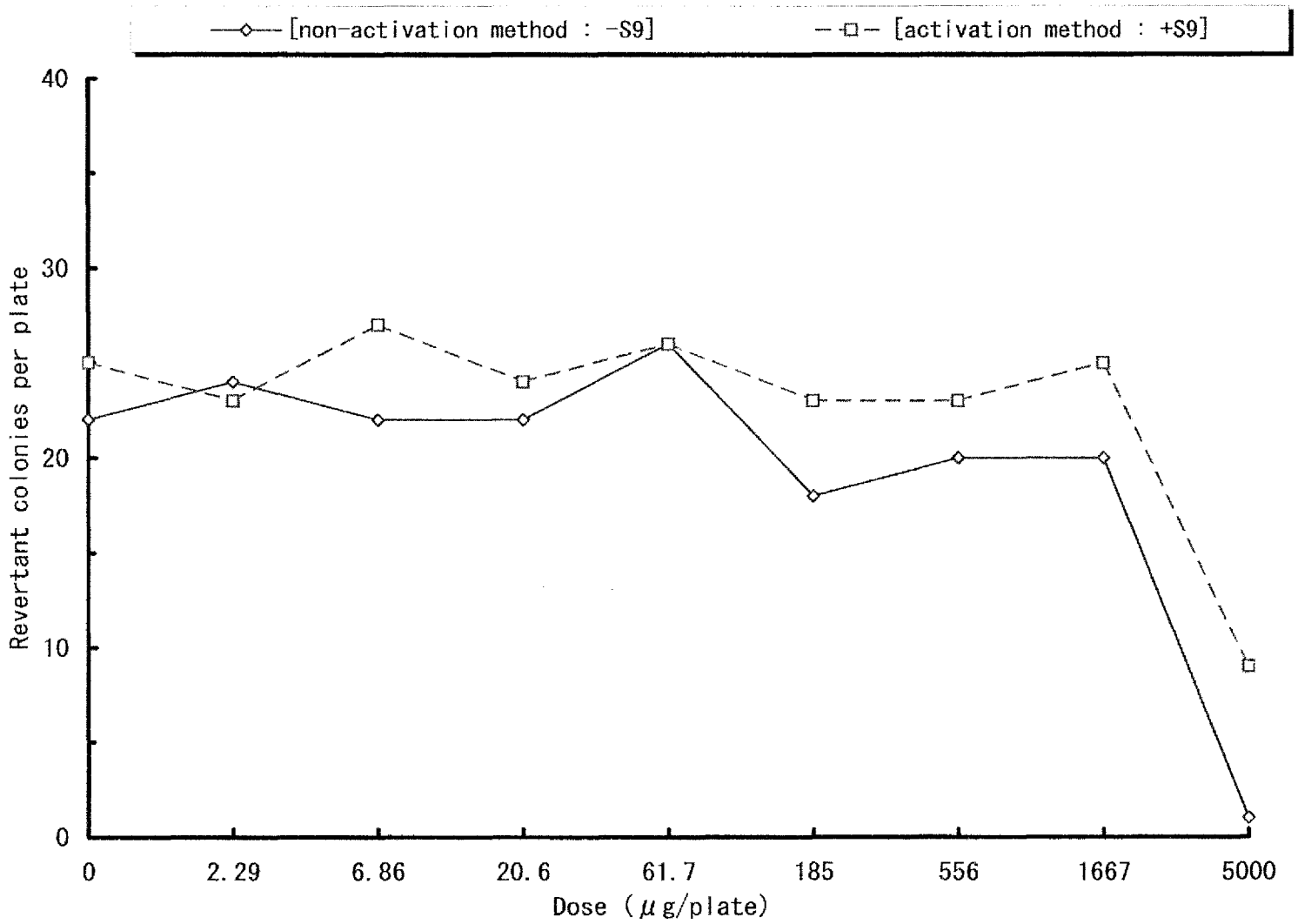


Figure 3. Dose-finding study with Aniline, 2, 6-dimethyl- in strain WP2*uvrA*

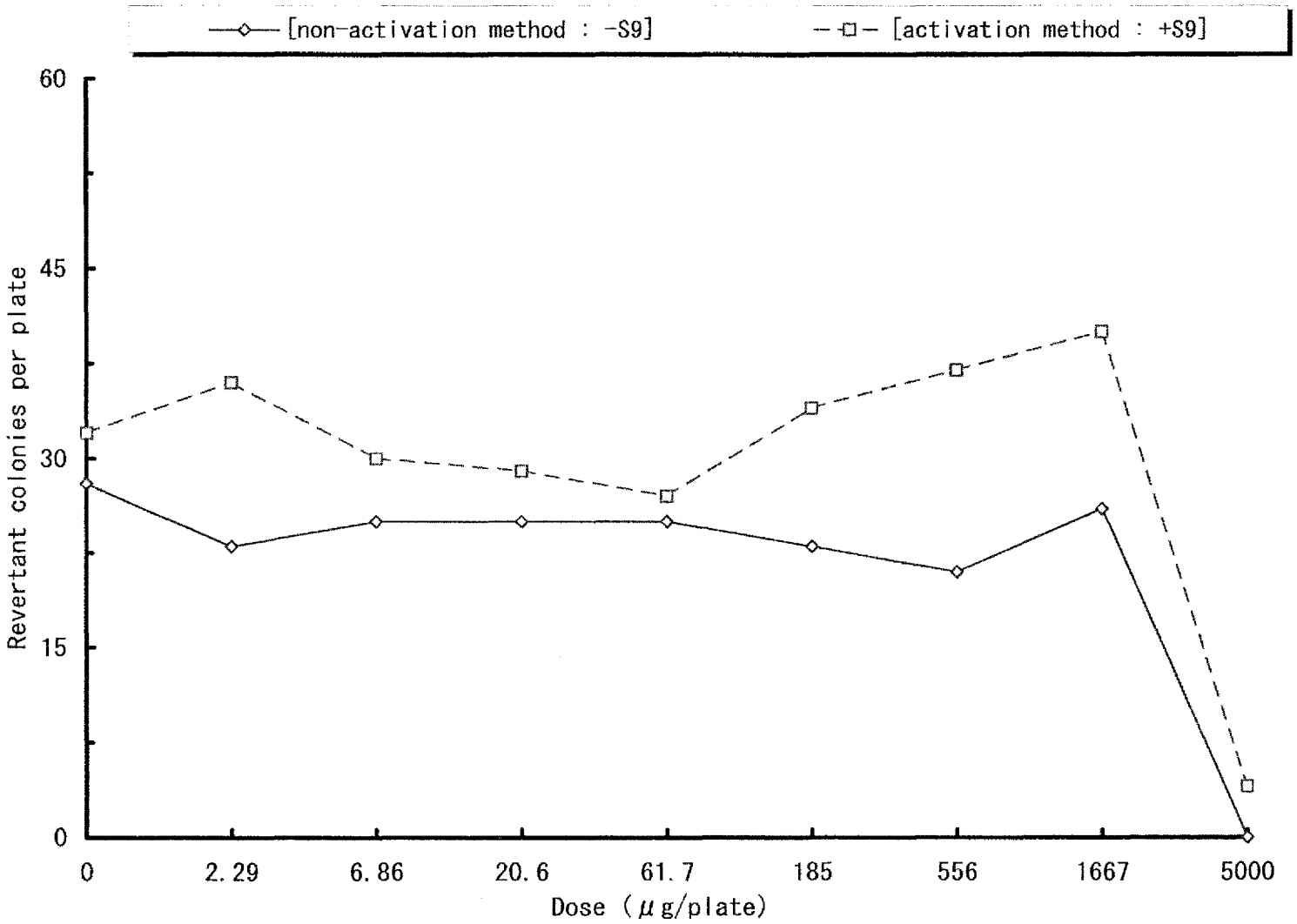


Figure 4. Dose-finding study with Aniline, 2, 6-dimethyl- in strain TA98

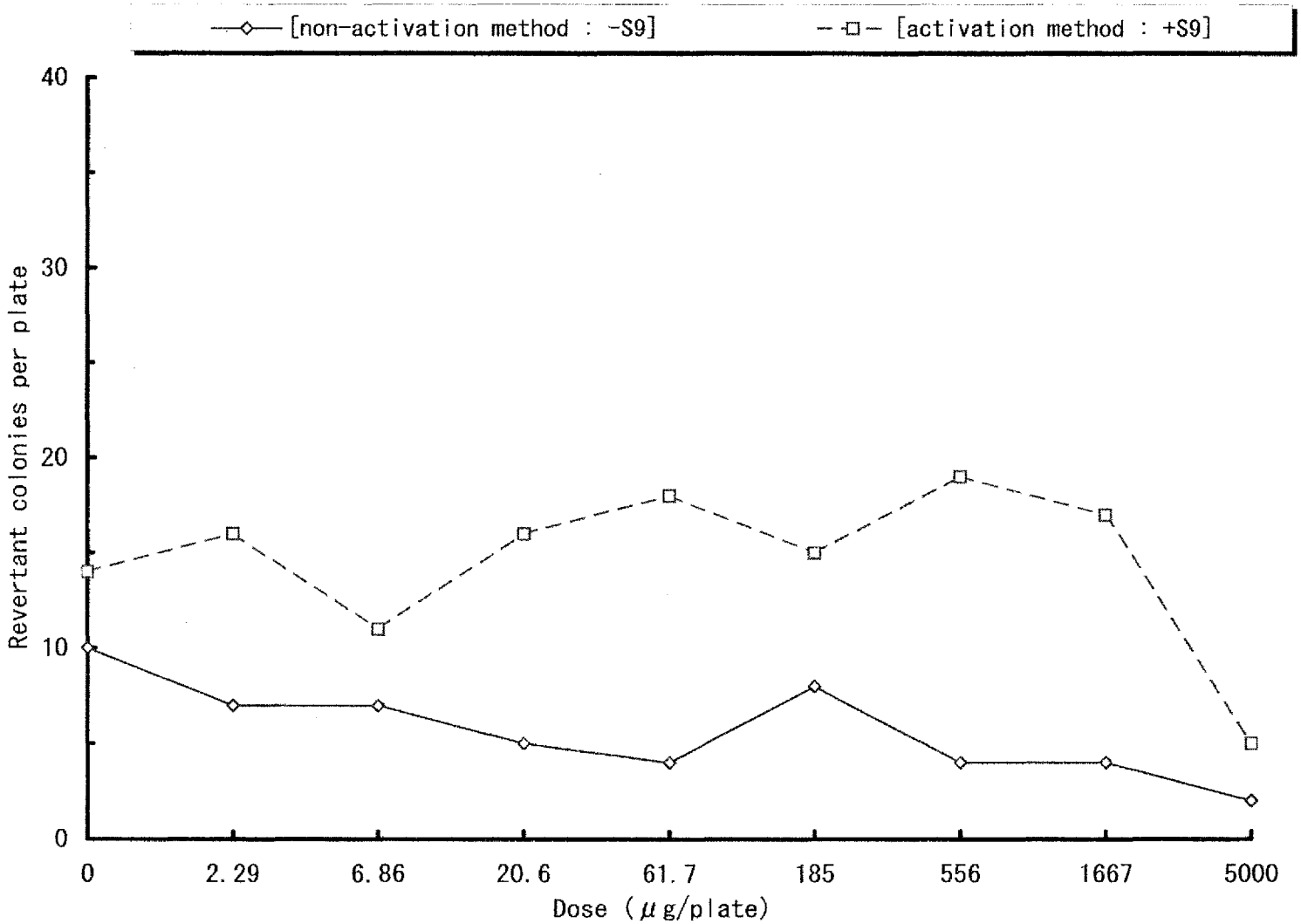


Figure 5. Dose-finding study with Aniline, 2, 6-dimethyl- in strain TA1537

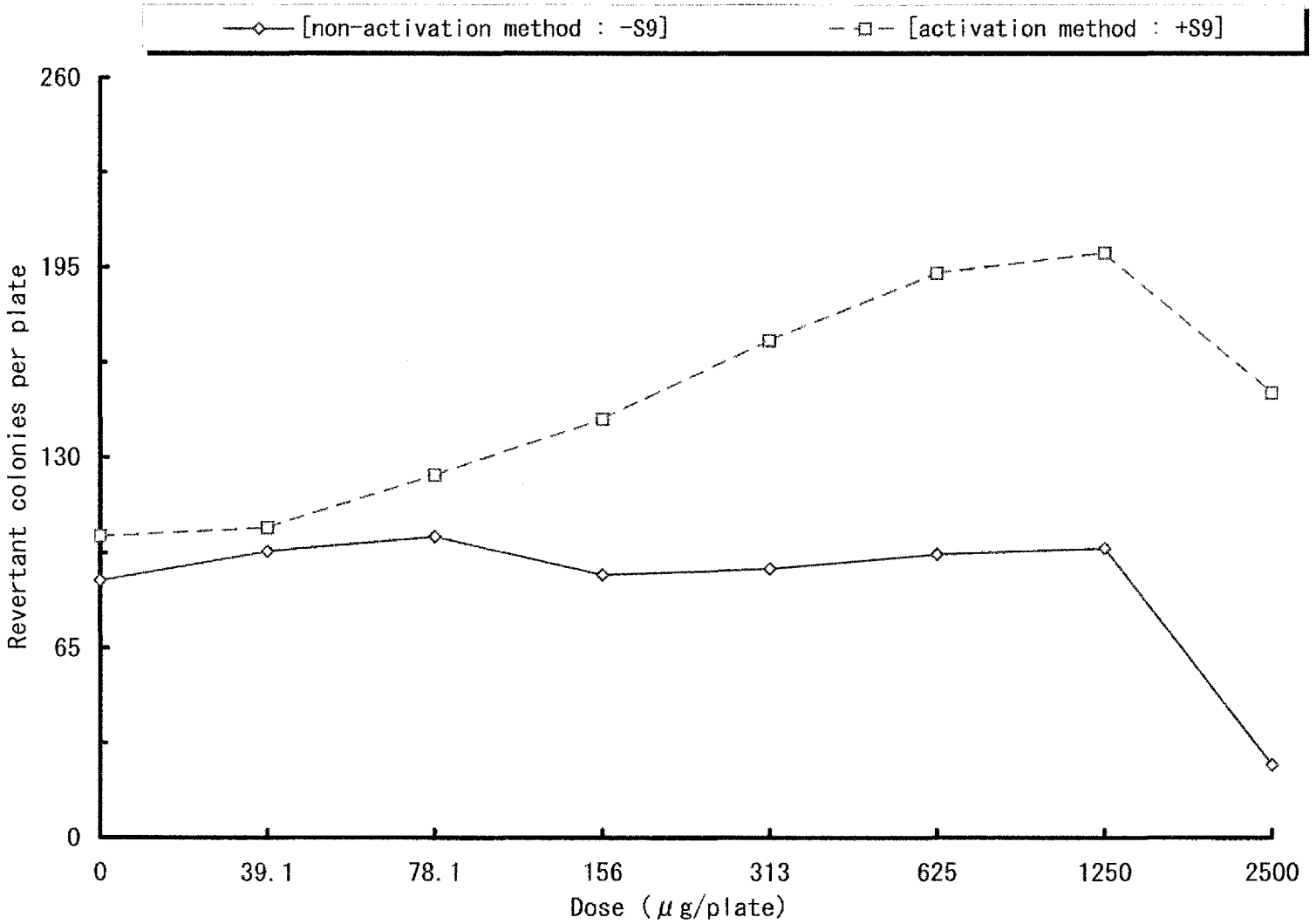


Figure 6. Bacterial reversion assay of Aniline, 2, 6-dimethyl- in strain TA100

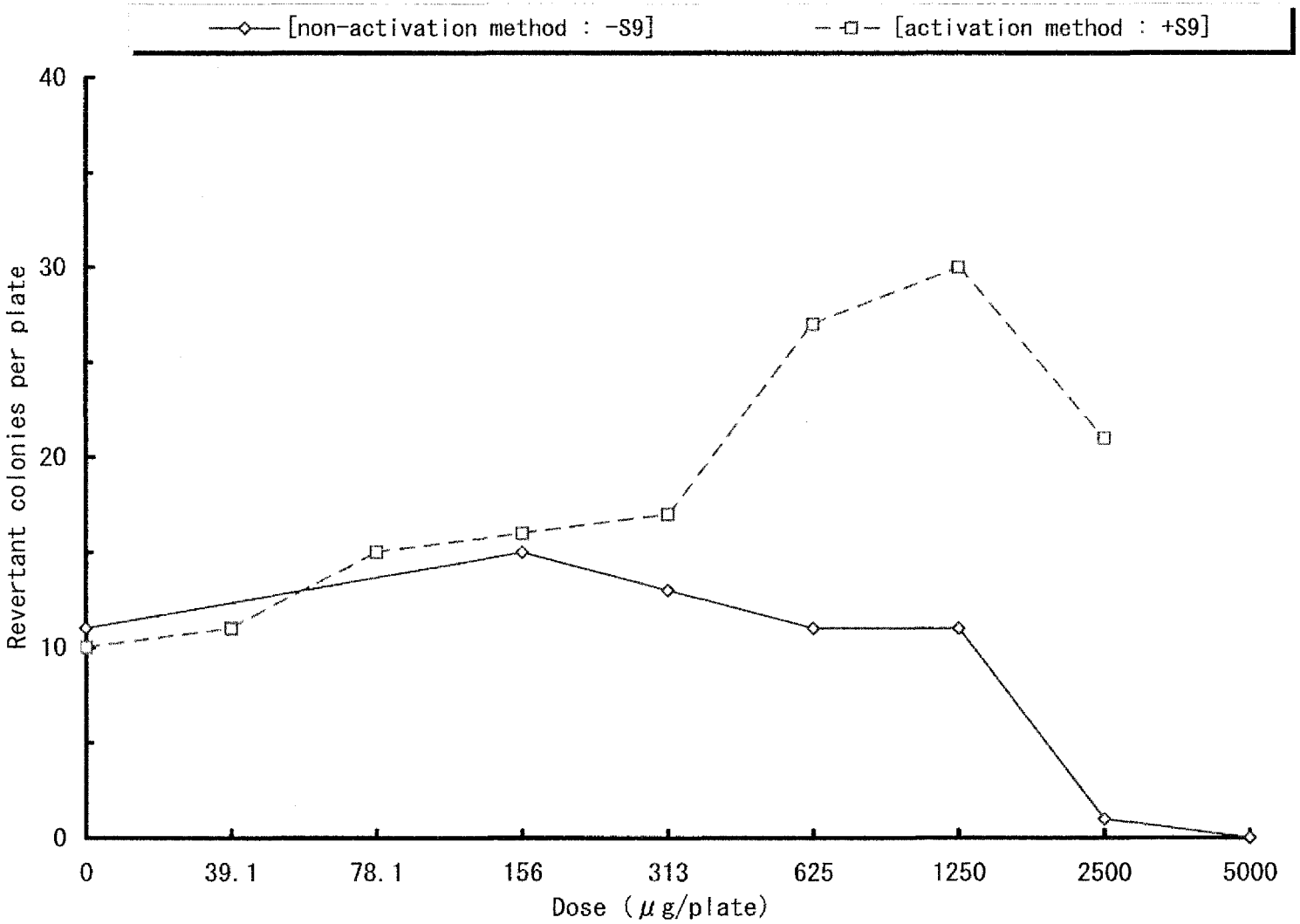


Figure 7. Bacterial reversion assay of Aniline, 2, 6-dimethyl- in strain TA1535

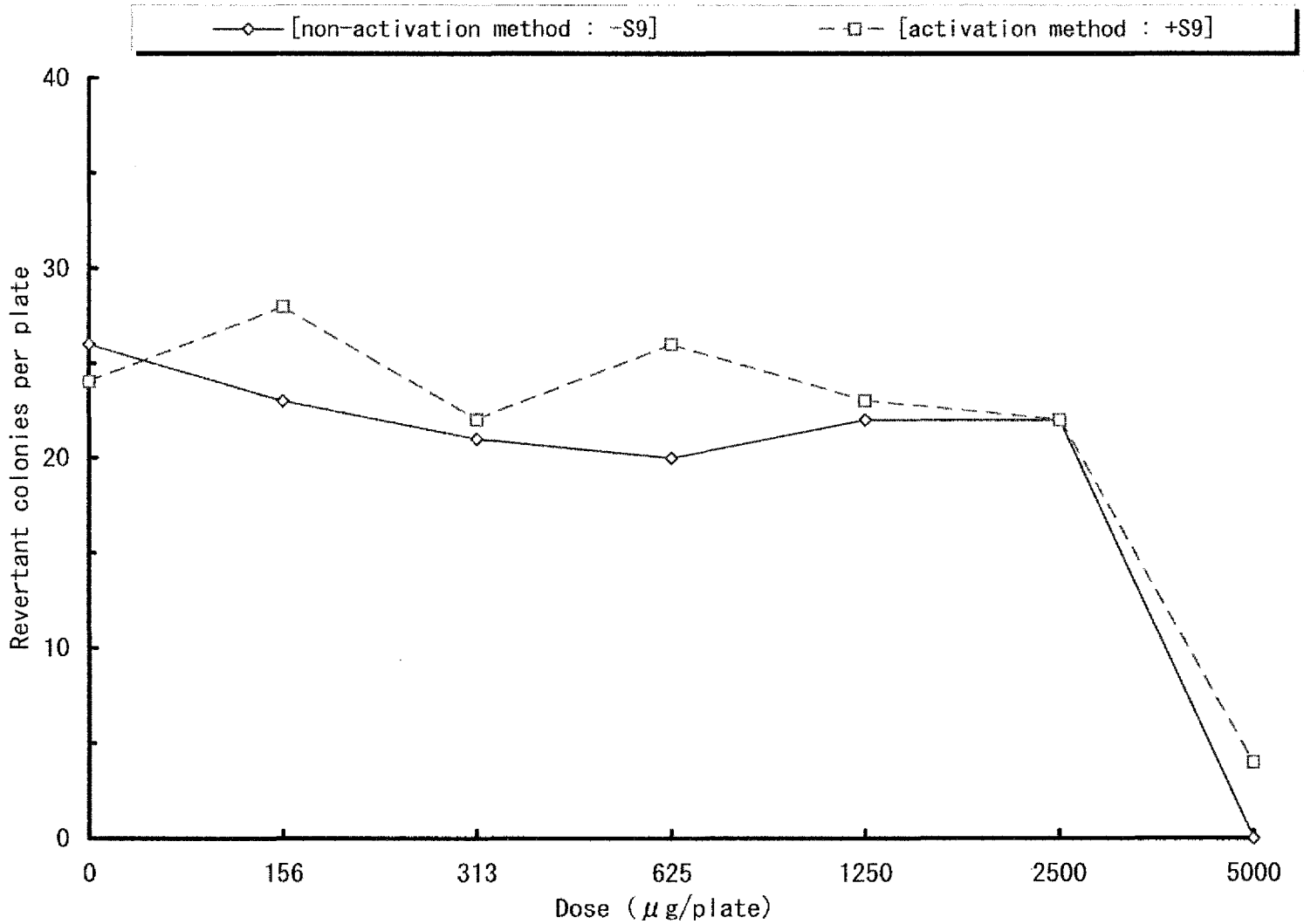


Figure 8. Bacterial reversion assay of Aniline, 2, 6-dimethyl- in strain WP2*uvrA*

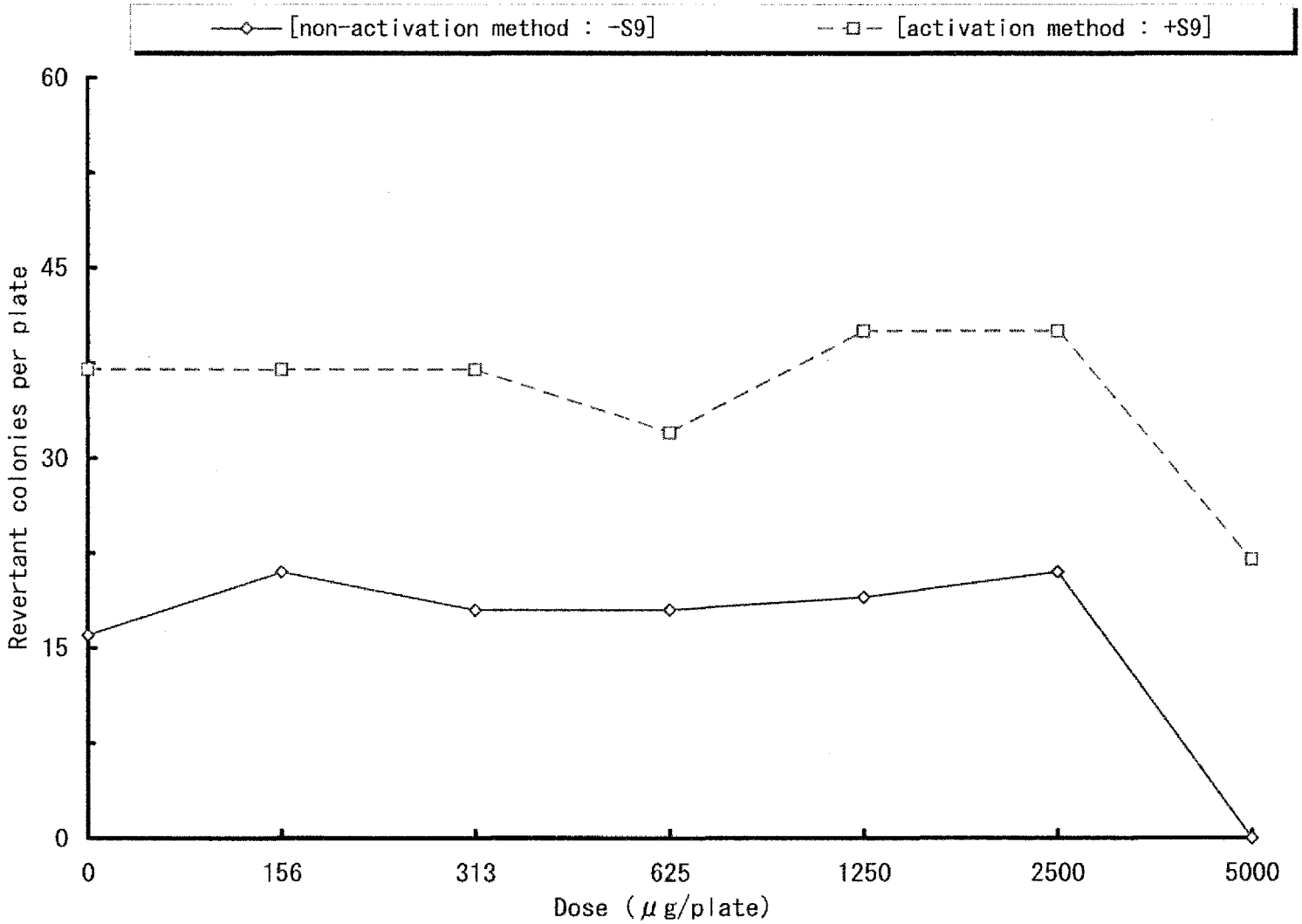


Figure 9. Bacterial reversion assay of Aniline, 2, 6-dimethyl- in strain TA98

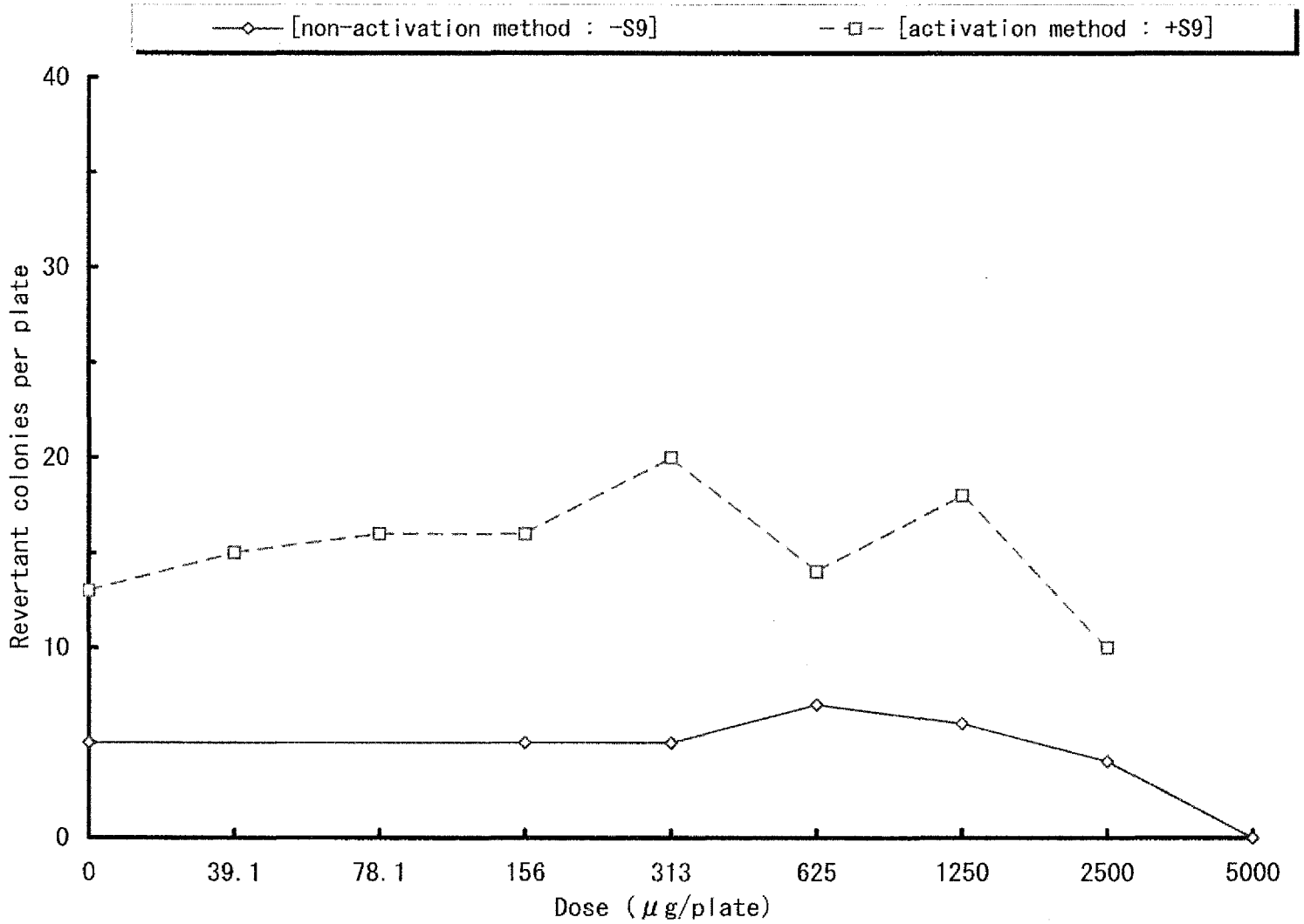


Figure 10. Bacterial reversion assay of Aniline, 2, 6-dimethyl- in strain TA1537

Exp. No. 6871 (115-168)

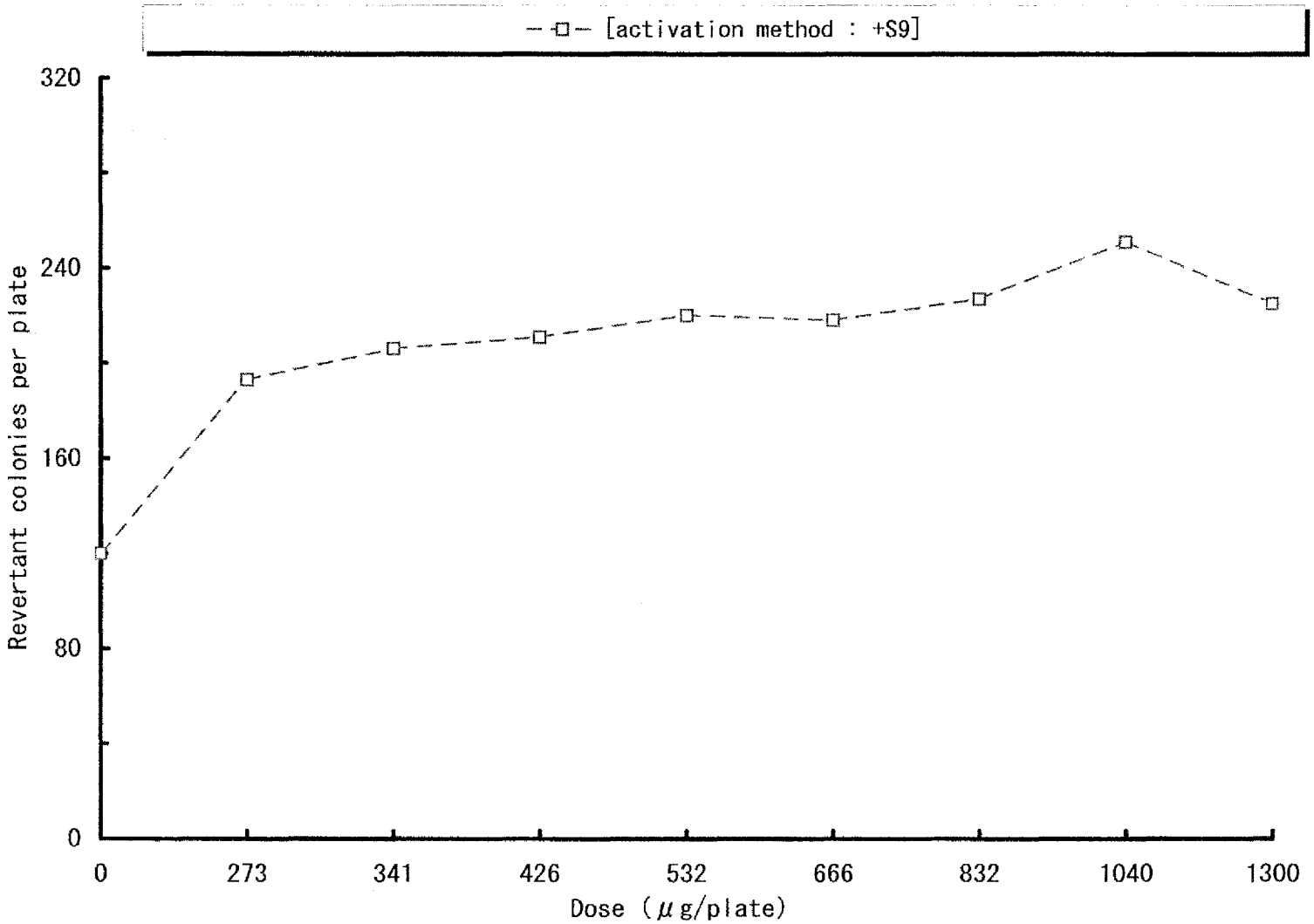


Figure 11. Bacterial reversion assay (confirmative examination) of Aniline, 2, 6-dimethyl- in strain TA100

Table 1. Summary data of dose-finding study with Aniline, 2, 6-dimethyl- [non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2*uvrA*			TA98			TA1537		
Test substance	0	77	82	80	9	8	8	21	24	22	30	24	30	12	10	9
		[80	±	3]	[8	±	1]	[22	±	2]	[28	±	3]	[10	±	2]
	2.29	84	97	90	10	10	11	28	24	21	21	25	24	9	5	6
		[90	±	7]	[10	±	1]	[24	±	4]	[23	±	2]	[7	±	2]
	6.86	86	76	84	11	6	9	20	25	21	28	21	25	5	7	8
		[82	±	5]	[9	±	3]	[22	±	3]	[25	±	4]	[7	±	2]
	20.6	100	88	93	14	11	12	22	24	20	30	22	23	5	4	7
		[94	±	6]	[12	±	2]	[22	±	2]	[25	±	4]	[5	±	2]
	61.7	101	105	103	4	6	7	25	26	26	22	21	32	4	4	4
		[103	±	2]	[6	±	2]	[26	±	1]	[25	±	6]	[4	±	0]
	185	94	87	92	10	9	9	20	16	18	21	26	21	7	8	8
		[91	±	4]	[9	±	1]	[18	±	2]	[23	±	3]	[8	±	1]
	556	101	92	101	9	11	12	18	24	19	25	17	20	6	3	4
		[98	±	5]	[11	±	2]	[20	±	3]	[21	±	4]	[4	±	2]
	1667	92 *	93 *	76 *	11	10	8	18	19	23	23	28	27	1	7	4
		[87	±	10]	[10	±	2]	[20	±	3]	[26	±	3]	[4	±	3]
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	4 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	3 *	3 *
		[0	±	0]	[0	±	0]	[1	±	2]	[0	±	0]	[2	±	2]
Positive control		332	276	311 a)	553	562	563 b)	110	125	144 a)	568	522	545 c)	282	333	319 d)
		[306	±	28]	[559	±	6]	[126	±	17]	[545	±	23]	[311	±	26]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5 μg/plate
c): AF-2, 0.1 μg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μg/plate
* : Growth inhibision was observed

Table 2. Summary data of dose-finding study with Aniline, 2, 6-dimethyl-
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Test substance	0	87 99 94 [93 ± 6]	8 8 11 [9 ± 2]	24 27 23 [25 ± 2]	35 31 29 [32 ± 3]	15 12 14 [14 ± 2]
	2.29	121 101 96 [106 ± 13]	10 8 12 [10 ± 2]	23 20 27 [23 ± 4]	36 34 37 [36 ± 2]	20 12 17 [16 ± 4]
	6.86	86 96 88 [90 ± 5]	8 13 11 [11 ± 3]	22 29 29 [27 ± 4]	32 28 31 [30 ± 2]	13 9 11 [11 ± 2]
	20.6	97 111 109 [106 ± 8]	8 10 9 [9 ± 1]	26 24 21 [24 ± 3]	30 28 30 [29 ± 1]	13 19 16 [16 ± 3]
	61.7	104 103 100 [102 ± 2]	13 11 13 [12 ± 1]	25 23 31 [26 ± 4]	25 32 25 [27 ± 4]	15 20 18 [18 ± 3]
	185	159 143 156 [153 ± 9]	18 15 14 [16 ± 2]	24 21 25 [23 ± 2]	37 32 34 [34 ± 3]	16 14 16 [15 ± 1]
	556	234 231 202 [222 ± 18]	23 27 28 [26 ± 3]	23 21 24 [23 ± 2]	40 39 31 [37 ± 5]	21 17 19 [19 ± 2]
	1667	175 * 187 * 162 * [175 ± 13]	30 * 33 * 37 * [33 ± 4]	27 21 26 [25 ± 3]	39 45 36 [40 ± 5]	17 * 20 * 13 * [17 ± 4]
	5000	0 * 0 * 0 * [0 ± 0]	0 * 0 * 0 * [0 ± 0]	21 * 4 * 1 * [9 ± 11]	4 * 8 * 0 * [4 ± 4]	3 * 10 * 1 * [5 ± 5]
Positive control		780 740 717 [a] [746 ± 32]	295 294 327 [b] [305 ± 19]	1200 1125 1110 [c] [1145 ± 48]	330 339 288 [d] [319 ± 27]	111 154 139 [b] [135 ± 22]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μg/plate b) : 2-AA, 2 μg/plate c) : 2-AA, 10 μg/plate d) : 2-AA, 0.5 μg/plate
* : Growth inhibision was observed

Table 3. Results of the bacterial reversion assay of Aniline, 2, 6-dimethyl-
[non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2*uvrA*			TA98			TA1537		
Test substance	0	75	95	95	13	8	11	31	23	24	16	13	19	5	5	4
		[88	±	12]	[11	±	3]	[26	±	4]	[16	±	3]	[5	±	1]
	39.1	90	106	99												
		[98	±	8]												
	78.1	119	101	89												
		[103	±	15]												
	156	94	95	82	13	15	16	25	24	21	22	19	23	6	4	4
		[90	±	7]	[15	±	2]	[23	±	2]	[21	±	2]	[5	±	1]
	313	91	104	82	17	12	9	28	17	19	19	16	19	5	5	4
		[92	±	11]	[13	±	4]	[21	±	6]	[18	±	2]	[5	±	1]
	625	112	89	90	10	13	11	16	21	24	19	16	20	8	6	6
		[97	±	13]	[11	±	2]	[20	±	4]	[18	±	2]	[7	±	1]
	1250	84 *	102 *	112 *	13	12	7	24	23	18	22	19	16	6	5	7
		[99	±	14]	[11	±	3]	[22	±	3]	[19	±	3]	[6	±	1]
	2500	25 *	31 *	20 *	4 *	0 *	0 *	25 *	18 *	23 *	23 *	25 *	14 *	4 *	3 *	5 *
		[25	±	6]	[1	±	2]	[22	±	4]	[21	±	6]	[4	±	1]
	5000				0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
					[0	±	0]	[0	±	0]	[0	±	0]	[0	±	0]
Positive control		318	287	257 a)	595	603	603 b)	143	125	143 a)	607	601	568 c)	205	211	173 d)
		[287	±	31]	[600	±	5]	[137	±	10]	[592	±	21]	[196	±	20]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5 μg/plate
c): AF-2, 0.1 μg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μg/plate
* : Growth inhibision was observed

Table 4. Results of the bacterial reversion assay of Aniline, 2, 6-dimethyl-
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Test substance	0	95 103 111 [103 ± 8]	9 11 10 [10 ± 1]	22 30 21 [24 ± 5]	38 34 39 [37 ± 3]	15 12 12 [13 ± 2]
	39.1	94 111 113 [106 ± 10]	9 13 10 [11 ± 2]			13 12 19 [15 ± 4]
	78.1	114 125 134 [124 ± 10]	14 14 16 [15 ± 1]			18 16 13 [16 ± 3]
	156	156 133 139 [143 ± 12]	14 14 19 [16 ± 3]	28 26 31 [28 ± 3]	42 33 35 [37 ± 5]	14 19 16 [16 ± 3]
	313	176 173 161 [170 ± 8]	18 15 18 [17 ± 2]	25 22 20 [22 ± 3]	39 39 33 [37 ± 3]	20 18 23 [20 ± 3]
	625	193 197 190 [193 ± 4]	24 30 28 [27 ± 3]	28 22 29 [26 ± 4]	28 34 33 [32 ± 3]	13 16 12 [14 ± 2]
	1250	205 * 215 * 179 * [200 ± 19]	27 28 36 [30 ± 5]	21 20 29 [23 ± 5]	40 44 36 [40 ± 4]	18 16 19 [18 ± 2]
	2500	169 * 155 * 133 * [152 ± 18]	15 * 27 * 21 * [21 ± 6]	25 * 21 * 20 * [22 ± 3]	38 * 41 * 41 * [40 ± 2]	8 * 12 * 10 * [10 ± 2]
	5000			0 * 0 * 12 * [4 ± 7]	24 * 19 * 22 * [22 ± 3]	
Positive control		908 878 851 a) [879 ± 29]	353 342 350 b) [348 ± 6]	934 1023 1072 c) [1010 ± 70]	387 358 394 d) [380 ± 19]	215 200 210 b) [208 ± 8]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate
* : Growth inhibision was observed

Table 5. Results of the bacterial reversion assay (confirmative examination) of Aniline, 2, 6-dimethyl- [activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.] TA100		
Test substance	0	124	107	129
		[120	±	12]
	273	174	204	200
		[193	±	16]
	341	201	215	202
		[206	±	8]
	426	205	212	216
		[211	±	6]
	532	208	222	230
		[220	±	11]
	666	229	228	196
		[218	±	19]
	832	224	219	239
		[227	±	10]
	1040	246 *	257 *	250 *
		[251	±	6]
	1300	220 *	231 *	224 *
		[225	±	6]
Positive control		739	736	711 a)
		[729	±	15]
(Without S9mix) Negative control		103	113	94
		[103	±	10]

Compound	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]		
(Without S9mix) Positive control	371	446	421 b)
	[413	±	38]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μg/plate b) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μg/plate
* : Growth inhibision was observed