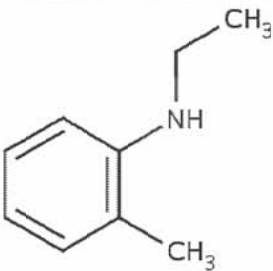


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	N-エチル-2-メチルアニリン		
別 名	Benzenamine, N-ethyl-2-methyl-、N-ethyl-o-toluidine		
構造式又は示性式			
試験に供した 化学物質の純度	99.9%	試験に供した 化学物質の Lot No.	MJVXJ-PP
不純物の名称及び 含有率(濃度)	—		
C A S 番 号	94-68-8	蒸 気 圧	—
分 子 量	135.21	分 配 係 数 (1-オクタノール/水分配係数)	—
融 点	—		
沸 点	214℃	常温における性状	わずかに薄い黄色～黄色 の透明液体
安 定 性	水：— 光：— 熱：—		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	水	難溶[50mg/ml 未満]*	—
	DMSO	溶解[100mg/ml 以上]*	—

*日本バイオアッセイ研究センターの試験による。

2 試験に用いた菌株

菌 株 名	入 手 先	入 手 年 月 日
TA100	東京大学医科学研究所癌生物学研究部	1985年 6月 21日
TA1535	同 上	1988年 5月 16日
TA98	同 上	1988年 5月 16日
TA1537	同 上	1988年 5月 16日
WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	同 上	1983年 6月 29日

3 S9 mix

(1) S9 の入手方法等

自 製 ・ 購 入 の 別	1. 自 製 ②. 購 入 (製造元: キッコーマンバイオケミファ株式会社)
製 造 年 月 日	2014年 5月 23日 製造
購入の場合のLot No.	RAA201405A
保 存 温 度	-80°C (保存機器名 三洋電機株式会社 MDF-392AT)

(2) S9 の調製方法

使 用 動 物		誘 導 物 質	
種・系統	ラット・ Sprague-Dawley (Slc:SD)	名 称	フェノバルビタール (PB) 及び 5, 6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄		
週 齢	7 週	投 与 方 法	腹 腔 内 投 与
体 重	182~247 g	投与期間及び投与量 (g/ kg 体重)	1 日目 (投与開始日) : PB 0.03 2 日目~4 日目 : PB 0.06 3 日目 : BF 0.08

(3) S9 mix の組成

成 分	S9 mix 1 ml 中の量	成 分	S9 mix 1 ml 中の量
S9	0.1 ml	NADPH	4 μ mol
MgCl ₂	8 μ mol	NADH	4 μ mol
KCl	33 μ mol	Na-リン酸緩衝液	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	その他 (-)	-

4 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	ジメチルスルホキシド (DMSO)	SIGMA-ALDRICH Co.	SHBB3671V	anhydrous	≥99.9
溶媒選択の理由	被験物質の溶解度は、水に 50 mg/ml 未満であるが、DMSO に 100 mg/ml [被験物質溶液量をプレート当り 50 μ l にした場合に 5000 μ g の被験物質に相当する] 以上であり、被験物質に DMSO を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかったことから溶媒に DMSO を選択した。				
被験物質溶液の性状	溶解 懸濁 その他 ()				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用量設定試験	1時間	20分、	25°C	
	本試験		30分、	25°C	
	本試験-2		30分、	25°C	
純度換算の有無	有			無	

5 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Oxoid ニュートリエントブロス No.2	OXOID LTD.	941971
前 培 養 時 間	10時間00分		
培養容器 (形状・容量)	形 状 : 三角フラスコ	容 量 : 62.5 ml	
培 養 液 量	15 ml	接種菌量	30 μ l

(2) 前培養終了時の生菌数等

菌 株 名		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/ pKM101	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$ / ml)	用量設定試験	2.18	3.23	4.10	2.55	2.45
	本 試 験	2.18	3.21	4.08	2.46	2.33
	本 試 験 - 2	2.22	3.35	3.90	2.56	2.45
測 定 方 法 (いずれかを○で囲むこと)		1. O.D. 値よりの換算 2. 段階希釈法 3. その他 ()				

6 最少グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1. 自製 (2.) 購入(製造元：オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2014年7月24日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI360GD
使用寒天の名称・ 製造元・Lot No. 等	使用寒天の名称：伊那寒天 BA-30A 製造元：伊那食品工業株式会社 Lot No. : 31122

7 試験の方法

(1) 試験方法とその選定理由

採用した試験方法	(1.) プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他 ()
その他の場合は その選定理由	—

(2) 試験条件 (プレート当たり)

プレインキュベーション法		
組 成	菌懸濁液	0.1 ml
	被験物質溶液	0.05 ml
	Na-リン酸緩衝液(直接法による場合)	0.5 ml
	S9 mix(代謝活性化法による場合)	0.5 ml
	トップアガー	2 ml
プレインキュベーション	温 度	37 ℃
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 ℃
	時 間	48 時間

8 コロニー計測の方法

計測方法	1. マニュアル計測 (2.) 機器計測
補正の有無	1. 無 (2.) 有(補正の方法 面積及び数え落とし補正)

9 試験結果

(1) 試験の結果は別表による。

(2) 結果の判定

判 定	陽性 陰性
<p>[判定の理由]</p> <p>用量設定試験の結果を表-1に、本試験の結果を表-2及び図-1～10に、本試験-2の結果を表-3及び図-11～20に示した。</p> <p>用量設定試験を最高用量5000 μg/プレートより公比4の7用量で実施したところ、TA98、TA100、TA1535、TA1537及びWP2 <i>uvrA</i>/pKM101の直接法による場合及び代謝活性化法による場合に陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。</p> <p>最高用量を生育阻害を示す用量として本試験を実施したところ、TA98の代謝活性化法による場合に陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加がみられた。</p> <p>用量設定試験よりも生育阻害が強く認められ、TA98の代謝活性化法による場合に陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加がみられたため、結果の再現性を確認するため本試験-2を実施したところ、用量設定試験同様に陰性対照値の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。</p> <p>陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。</p> <p>以上の結果より、N-エチル-2-メチルアニリンの微生物に対する変異原性は、陰性と判定した。</p>	

(3) 参考事項

特記事項なし。

10 その他

試験実施施設	名称	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	
	所在地	〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445	電話 0463 (82) 3911 FAX 0463 (82) 3860
試験責任者	職氏名	[REDACTED]	
	経験年数	[REDACTED]	
試験番号	6376		
試験期間	2014年9月9日 ~ 2014年12月17日		

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：N-エチル-2-メチルアニリン

試験実施期間		2014年 9月 29日から 2014年 10月 2日												
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (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/pKM101	TA98		TA1537					
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	120 126	18 10	82 99	14 14	13 7	105 107 (115)	15 10 (13)	91 79 (88)	14 16 (15)	13 8 (10)			
	1.22	112	7	76	24	8	116 (114)	10 (9)	70 (73)	16 (20)	11 (10)			
	4.88	112	8	90	16	7	113 (113)	7 (8)	84 (87)	16 (16)	8 (8)			
	19.5	98	7	99	13	7	113 (106)	11 (9)	83 (91)	17 (15)	7 (7)			
	78.1	114	11	101	18	8	112 (113)	9 (10)	94 (98)	14 (16)	9 (9)			
	313	82	9	76	23	5	104 (93)	9 (9)	104 (90)	20 (22)	10 (8)			
	1250	0*	0*	0*	0*	0*	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)			
	5000	0*	0*	0*	0*	0*	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)			
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	117 113	6 9	84 111	30 18	9 9	128 112 (118)	10 8 (8)	105 91 (98)	22 16 (22)	8 11 (9)		
		1.22	127	9	106	21	9	123 (125)	9 (9)	96 (101)	26 (24)	6 (8)		
4.88		129	13	104	21	5	130 (130)	8 (11)	109 (107)	25 (23)	2 (4)			
19.5		145	6	133	18	11	152 (149)	11 (9)	106 (120)	14 (16)	11 (11)			
78.1		143	10	102	24	13	145 (144)	9 (10)	99 (101)	32 (28)	10 (12)			
313		102*	11*	89	30*	13*	123* (113*)	3* (7*)	101 (95)	34* (32*)	11* (12*)			
1250		0*	0*	0*	0*	0*	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)			
5000		0*	0*	0*	0*	0*	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)	0* (0*)			
陽性対照		S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
		コロニー数/プレート	686	356	974	408	524	638 (662)	360 (358)	825 (900)	459 (434)	662 (593)		
	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2	
	コロニー数/プレート	1452	294	814	496	200	1449 (1451)	263 (279)	790 (802)	533 (515)	212 (206)			

【備考】

1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、2-AA: 2-アミノアントラセン

表-2

試験結果表（本試験）

被験物質の名称：N-エチル-2-メチルアニリン

試験実施期間		2014年 10月 6日から 2014年 10月 9日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(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/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	83 109 97 107 (99)	3 9 3 14 (10)	89 90 81 83 (86)	14 15 17 22 (17)	8 14 10 11 (11)	
	19.5	119 104 (112)	10 3 (9)	92 112 (102)	20 9 (15)	9 14 (12)	
	39.1	74 91 (83)	7 10 (9)	108 99 (104)	22 14 (18)	11 11 (11)	
	78.1	77 96 (87)	2 14 (8)	86 96 (91)	22 15 (19)	13 13 (13)	
	156	101 86 (94)	6 7 (7)	94 94 (94)	22 22 (22)	13 10 (12)	
	313	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	
	625	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	
	1250	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	97 96 85 116 (99)	3 13 14 8 (11)	123 101 108 104 (109)	16 14 26 17 (18)	16 11 11 18 (14)	
	4.88	134 117 (126)	10 14 (12)	/	20 21 (21)	10 11 (11)	
	9.77	135 111 (123)	3 9 (9)	/	18 22 (20)	6 9 (8)	
	19.5	128 117 (123)	13 10 (12)	93 112 (103)	24 21 (23)	9 9 (9)	
	39.1	150 131 (141)	11 10 (11)	119 116 (118)	18 21 (20)	6 9 (8)	
	78.1	138 129 (134)	9 13 (11)	122 116 (119)	23 32 (28)	10 10 (10)	
	156	145* 126* (136*)	13* 3* (8*)	97 89 (93)	47* 30* (39*)	18* 17* (18*)	
	313	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	
	625	/	/	0* 0* (0*)	/	/	
	1250	/	/	0* 0* (0*)	/	/	
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称 AF-2 用量(μg/プレート)	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	AF-2 0.005	AF-2 0.1	9-AA 80
	コロニー数/プレート	682 654 (668)	309 303 (306)	903 827 (865)	477 471 (474)	608 619 (614)	
	S9 mixを必要とするもの	名称 2-AA 用量(μg/プレート)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 2	2-AA 0.5	2-AA 2
	コロニー数/プレート	1402 1445 (1424)	267 310 (289)	797 783 (790)	531 514 (523)	293 220 (257)	

【備考】

1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、2-AA: 2-アミノアントラセン

表-3

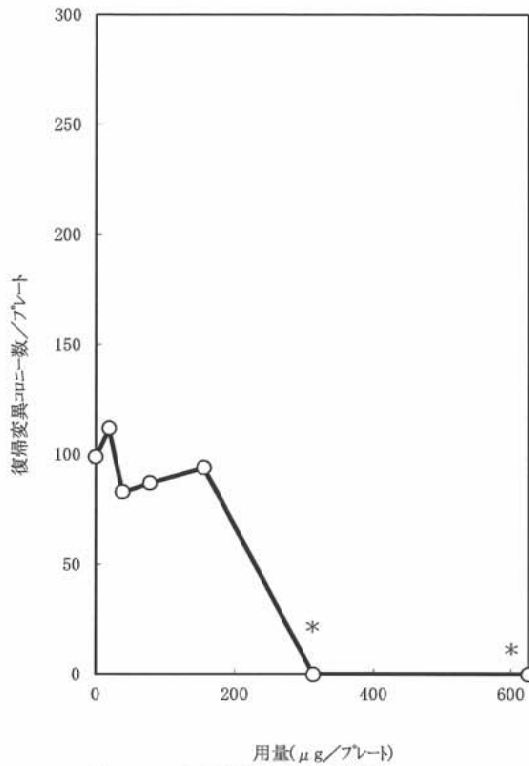
試験結果表（本試験-2）

被験物質の名称：N-エチル-2-メチルアニリン

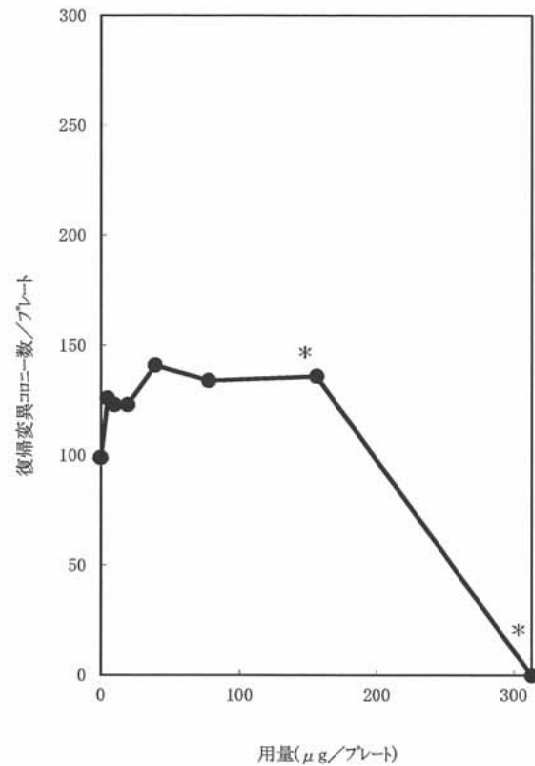
試験実施期間		2014年 10月 14日から 2014年 10月 17日							
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)							
		塩基対置換型			フレームシフト型				
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537			
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	101 102 100 89 (98)	17 9 13 13 (13)	89 98 102 90 (95)	23 20 17 17 (19)	11 14 11 8 (11)			
	9.77	104 86 (95)	13 10 (12)	89 112 (101)	22 20 (21)	15 9 (12)			
	19.5	116 90 (103)	14 11 (13)	89 66 (78)	24 10 (17)	11 14 (13)			
	39.1	104 98 (101)	7 9 (8)	98 82 (90)	21 16 (19)	10 9 (10)			
	78.1	111 111 (111)	9 8 (9)	84 89 (87)	25 24 (25)	10 8 (9)			
	156	97 105 (101)	5 11 (8)	89 94 (92)	21 18 (20)	15 11 (13)			
	313	92 115 (104)	11* 10* (11*)	81 78 (80)	18 22 (20)	15 13 (14)			
	625	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)		
	1250	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)		
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	102 90 106 97 (99)	11 8 7 9 (9)	105 105 107 108 (106)	24 23 20 22 (22)	15 15 14 18 (16)		
4.88		102 112 (107)	11 16 (14)	/	29 29 (29)	15 11 (13)			
9.77		116 134 (125)	13 7 (10)	106 97 (102)	24 21 (23)	10 7 (9)			
19.5		130 133 (132)	11 14 (13)	106 107 (107)	32 32 (32)	13 8 (11)			
39.1		134 121 (128)	5 13 (9)	115 123 (119)	32 33 (33)	7 8 (8)			
78.1		135 129 (132)	13 10 (12)	96 117 (107)	31 34 (33)	13 14 (14)			
156		111 138 (125)	10 14 (12)	94 99 (97)	23 30 (27)	13 8 (11)			
313		104* 122* (113*)	9* 9* (9*)	105 113 (109)	22* 33* (28*)	11* 10* (11*)			
625		/	/	0* 0* (0*)	/	/			
1250		/	/	0* 0* (0*)	/	/			
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称 用量(μg/プレート)	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	AF-2 0.005	AF-2 0.1	9-AA 80		
	コロニー数/プレート	639 702 (671)	326 352 (339)	1395 1246 (1321)	541 556 (549)	616 602 (609)			
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称 用量(μg/プレート)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 2	2-AA 0.5	2-AA 2		
	コロニー数/プレート	1471 1442 (1457)	278 273 (276)	817 813 (815)	523 491 (507)	236 186 (211)			

【備考】

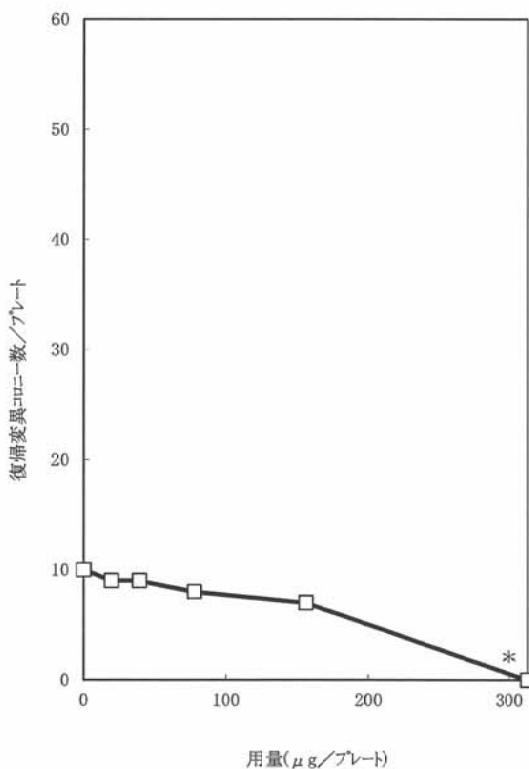
1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、2-AA: 2-アミノアントラセン



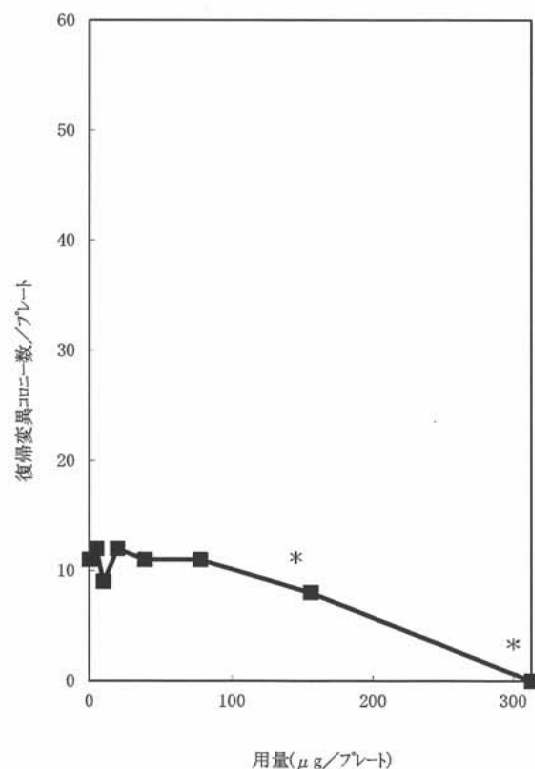
用量(μg/プレート)
 図-1 TA100における用量-反応曲線
 直接法による場合 (本試験)
 (625 μg/プレートまでプロットした。)



用量(μg/プレート)
 図-2 TA100における用量-反応曲線
 代謝活性化法による場合 (本試験)

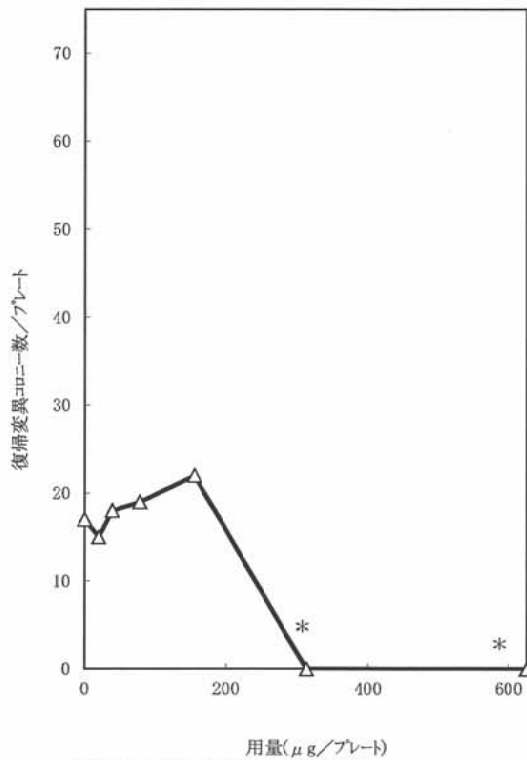


用量(μg/プレート)
 図-3 TA1535における用量-反応曲線
 直接法による場合 (本試験)
 (313 μg/プレートまでプロットした。)

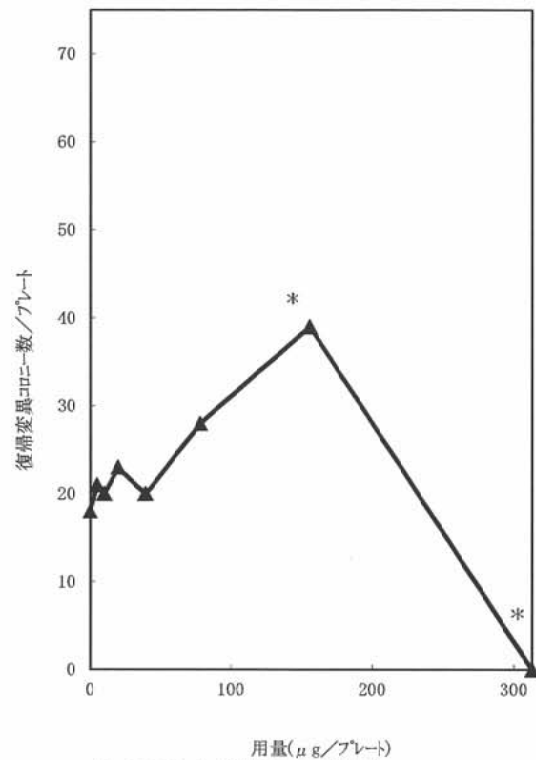


用量(μg/プレート)
 図-4 TA1535における用量-反応曲線
 代謝活性化法による場合 (本試験)

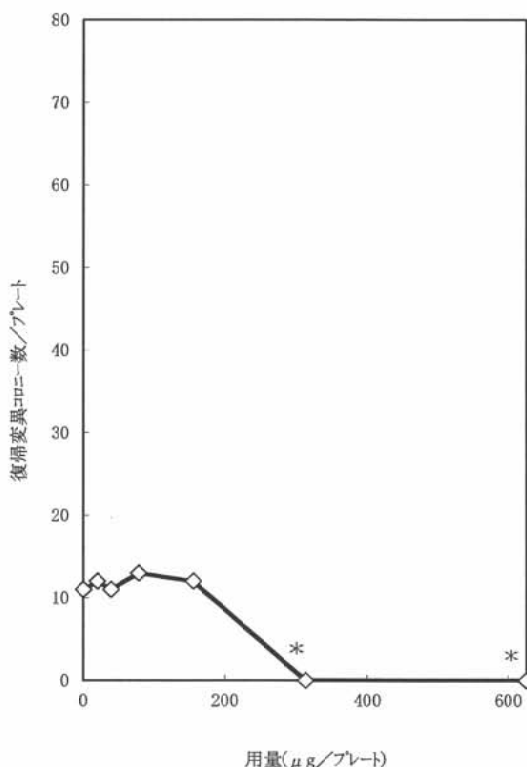
注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。



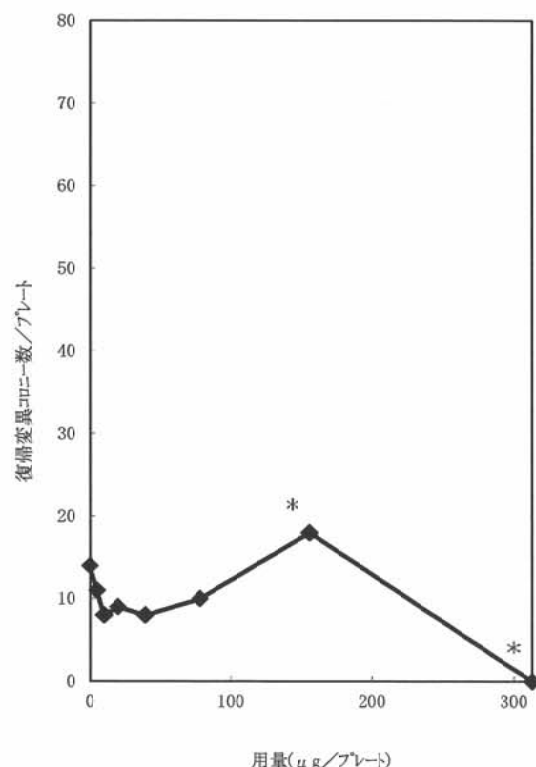
用量(μg/プレート)
 図-5 TA98における用量-反応曲線
 直接法による場合 (本試験)
 (625 μg/プレートまでプロットした。)



用量(μg/プレート)
 図-6 TA98における用量-反応曲線
 代謝活性化法による場合 (本試験)



用量(μg/プレート)
 図-7 TA1537における用量-反応曲線
 直接法による場合 (本試験)
 (625 μg/プレートまでプロットした。)



用量(μg/プレート)
 図-8 TA1537における用量-反応曲線
 代謝活性化法による場合 (本試験)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。

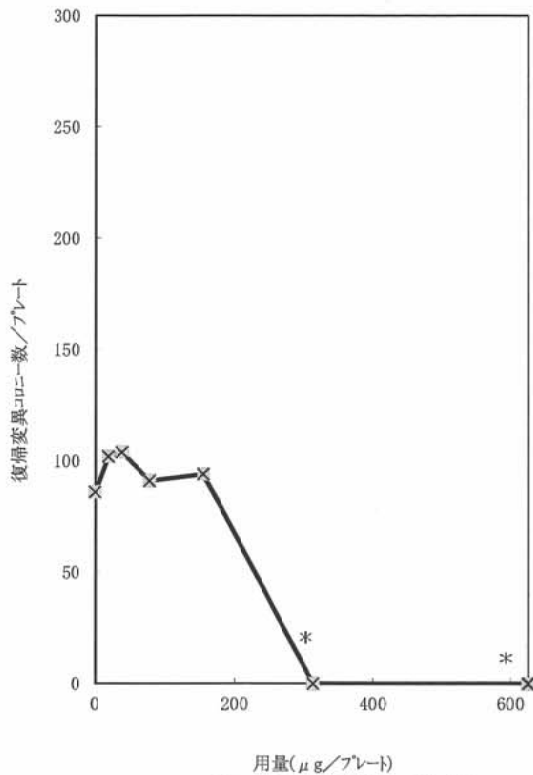


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)
(625 μg/プレートまでプロットした。)

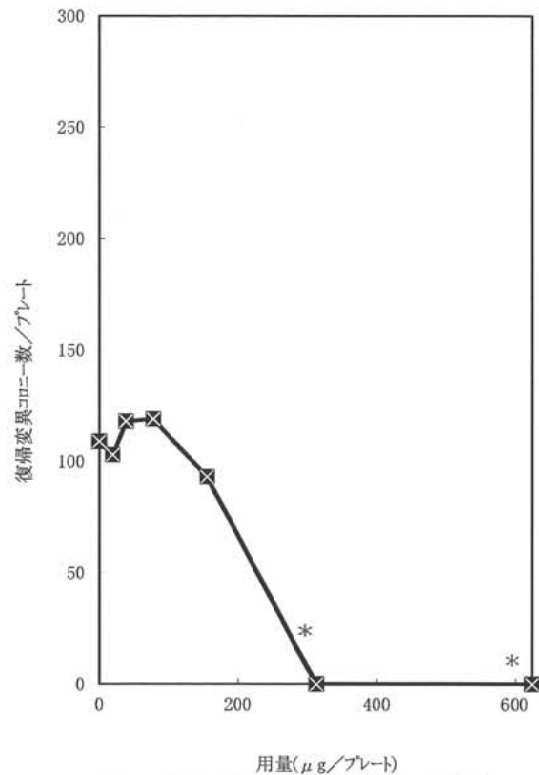


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)
(625 μg/プレートまでプロットした。)

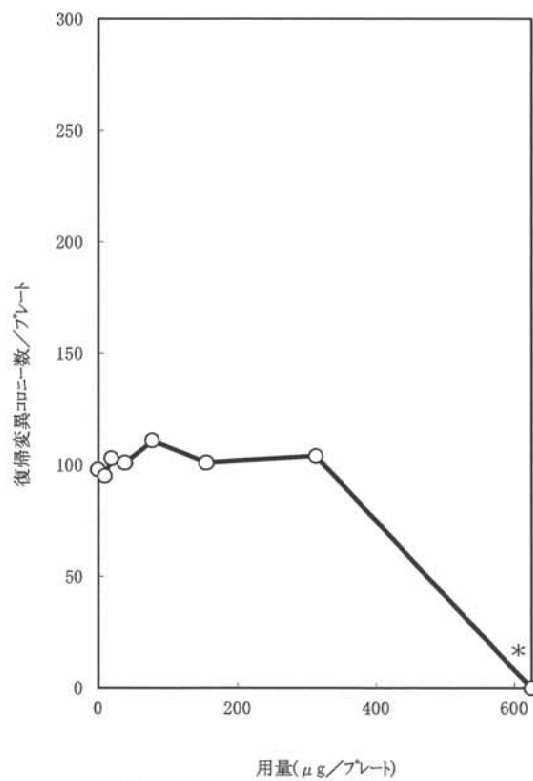


図-11 TA100における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験-2)
(625 μg/プレートまでプロットした。)

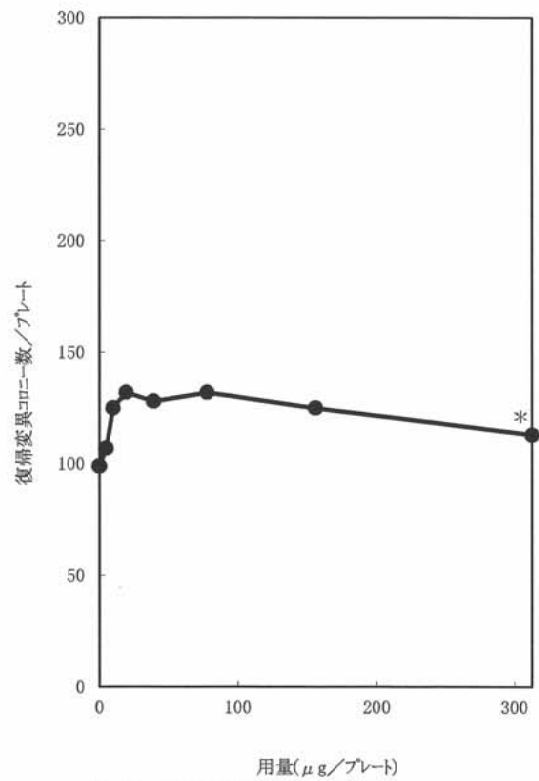
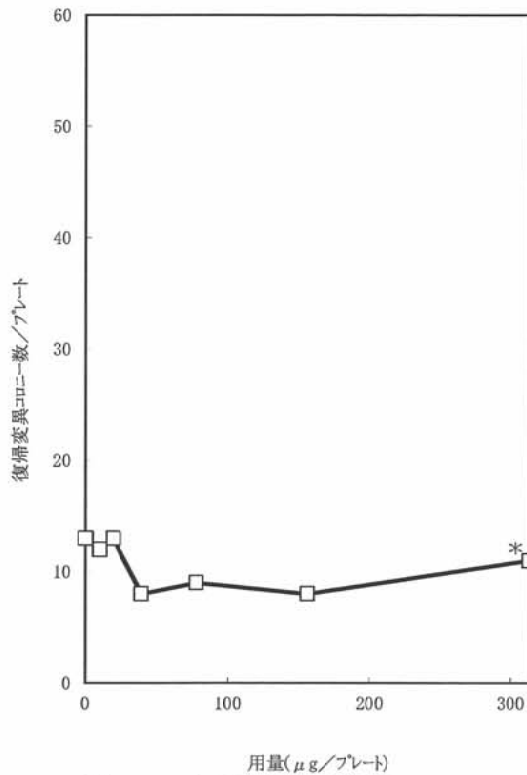
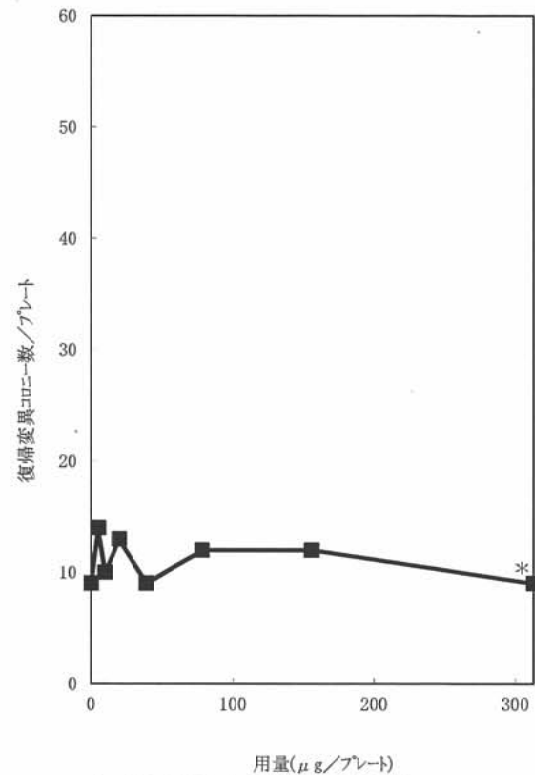


図-12 TA100における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験-2)

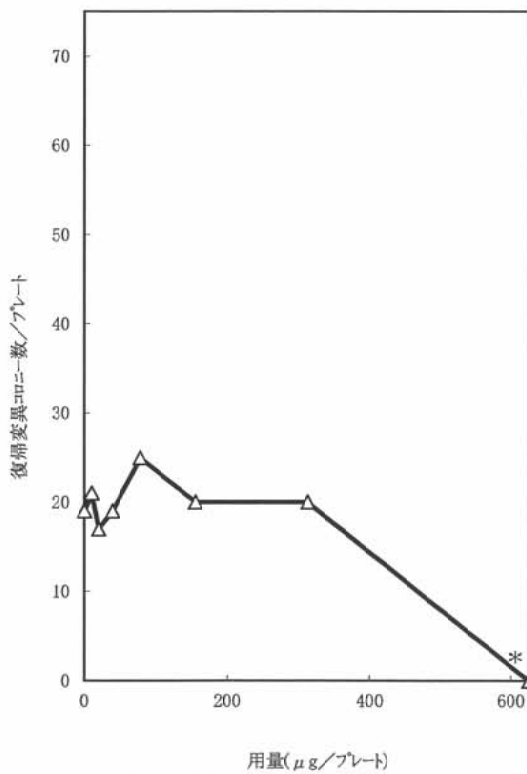
注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。



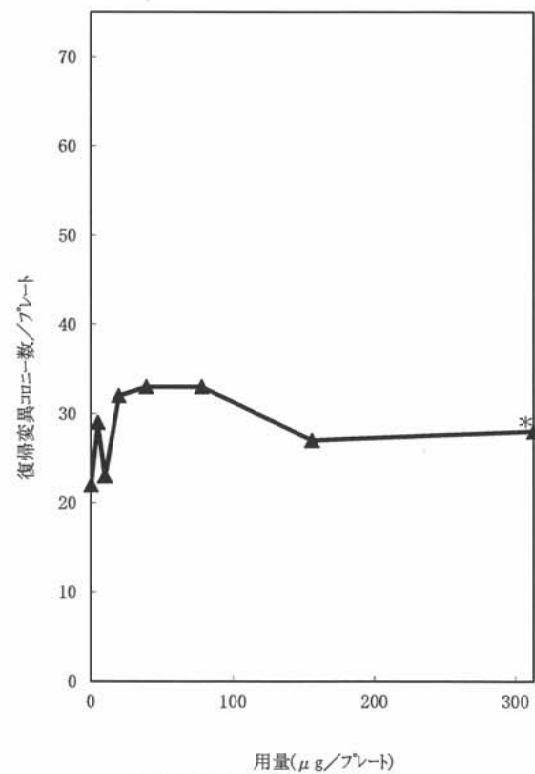
用量(μg/プレート)
 図-13 TA1535における用量-反応曲線
 直接法による場合 (本試験-2)
 (313 μg/プレートまでプロットした。)



用量(μg/プレート)
 図-14 TA1535における用量-反応曲線
 代謝活性化法による場合 (本試験-2)

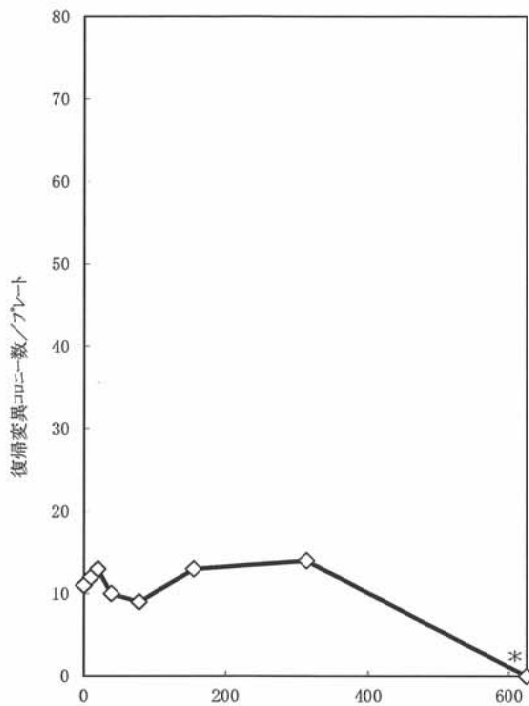


用量(μg/プレート)
 図-15 TA98における用量-反応曲線
 直接法による場合 (本試験-2)
 (625 μg/プレートまでプロットした。)

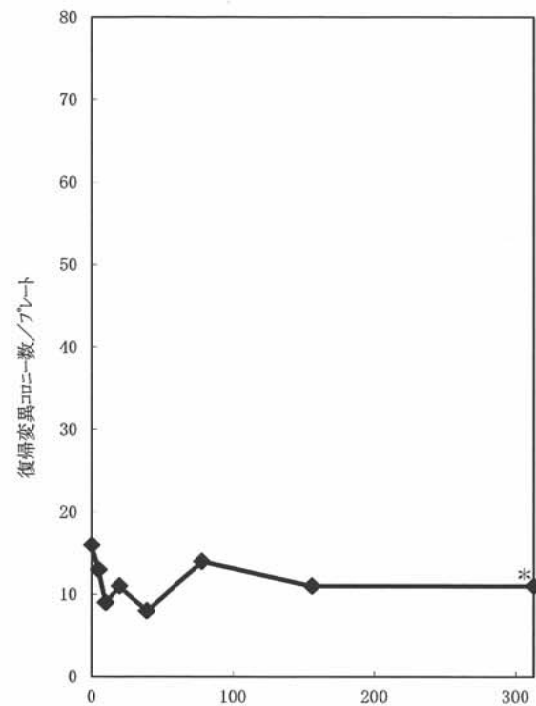


用量(μg/プレート)
 図-16 TA98における用量-反応曲線
 代謝活性化法による場合 (本試験-2)

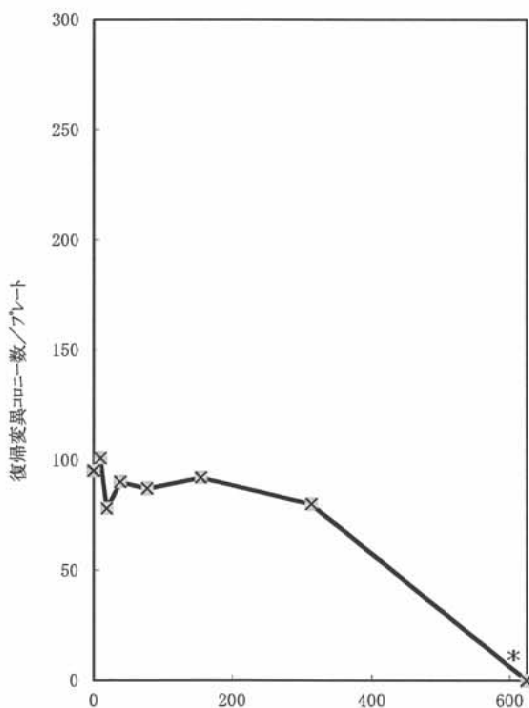
注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。



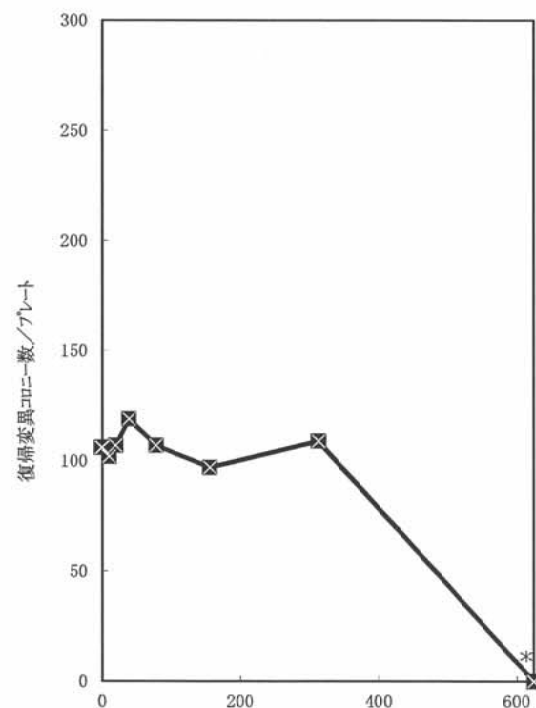
用量(μg/プレート)
 図-17 TA1537における用量-反応曲線
 直接法による場合 (本試験-2)
 (625 μg/プレートまでプロットした。)



用量(μg/プレート)
 図-18 TA1537における用量-反応曲線
 代謝活性化法による場合 (本試験-2)



用量(μg/プレート)
 図-19 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
 直接法による場合 (本試験-2)
 (625 μg/プレートまでプロットした。)



用量(μg/プレート)
 図-20 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
 代謝活性化法による場合 (本試験-2)
 (625 μg/プレートまでプロットした。)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。