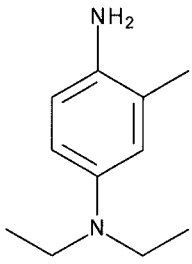


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2-アミノ-5-N, N-ジエチルアミノトルエン		
別 名			
構造式又は示性式 (い ずれも不明な場合はそ の製法の概要)			
試験に供した新規 化学物質の純度	95%	試験に供した新規 化学物質の Lot No.	V22T
不純物の名称及び濃度			
CAS 番号	148-71-0	蒸気圧	
分子量	178.27	分配係数	
融 点		常温における性状	液体
沸 点			
安定性			
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水	50 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	DMSO	50 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	アセトン		
	その他		

(備考) 上記被験物質情報は、製造元からの情報による。なお、溶解度及び溶媒中の安定性については、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果である。

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12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：株式会社ボゾリサーチセンター）
製造年月日	2019年9月6日製造
購入の場合 Lot No.	S9-190906
保存温度	-70°C 以下

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	PB& 5,6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間及び 投与量 (mg/kg 体重)	PB4日間連続投与: 30+60+60+60(mg/kg 体重) PB投与3日目BF投与: 80(mg/kg 体重)
体重	209.9~234.7 g		

(3) S9Mixの組成

成分	S9Mix 1mL 中の量	成分	S9Mix 1mL 中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 µmol
MgCl ₂	8 µmol	NADH	4 µmol
KCl	33 µmol	Na-リン酸緩衝液	100 µmol
グルコース-6-リン酸	5 µmol	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(%)
	DMSO	富士フイルム和光純薬株式会社	KCK3751	試薬特級	100.0%
溶媒選択の理由	本試験で使用する溶媒を選定するため、水、DMSOの50 mg/mLでの溶解性試験を実施した。その結果、いずれも不溶であったが、DMSOでは均一に分散した懸濁液が得られ、溶媒添加直後、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。溶媒添加1時間後においても色調変化等の反応性も認められなかったためDMSOを溶媒として選択した。なお、被験液の調製には、モレキュラシーブス 4A 1/16 (富士フイルム和光純薬株式会社; Lot No. YLP7563) で脱水したDMSOを使用した。				
被験物質溶液の性状	溶解 <input type="checkbox"/> 懸濁 <input checked="" type="checkbox"/> その他 <input type="checkbox"/>				
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	用時調製・室温				
純度換算の有無	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無				

5. 前培養の条件

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名称	製造元	Lot No.
	Nutrient Broth No.2	OXOID LTD.	2202237
前培養時間	9時間		
培養容器(形状・容器)	L字管・48mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	<i>S.typhimurium</i> 株 20 µL <i>E.coli</i> 株 10 µL

(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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	5.10	4.32	7.76	5.38	3.88
	本試験	5.09	4.51	7.76	5.58	4.28
	確認試験	5.10				
測定方法		<input checked="" type="checkbox"/> O.D.値より換算 <input type="checkbox"/> 段階希釈法 <input type="checkbox"/> その他				

6. 最小グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1. 自製 <input checked="" type="checkbox"/> 購入 (購入元 極東製薬工業株式会社)
製造年月日	2019年10月25日製造
購入の場合の Lot No.	DZAKB101
使用寒天の名称・製造・Lot No.	大洋寒天・SSK セールス株式会社・Lot No. BM-M5-273

7. 試験の方法

(1) 試験方法とその選択理由

採用した試験方法	<input checked="" type="checkbox"/> プレインキュベーション法 <input type="checkbox"/> プレート法 <input type="checkbox"/> その他
その他の場合は その選択理由	

(2) 試験条件

組 成	菌懸濁液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液（直接法による場合）	0.5 mL
	S9Mix（代謝活性化法による場合）	0.5 mL
	トップアガー	2.0 mL
プレインキュベーション	温度	37°C
	時間	20 分間
インキュベーション	温度	37°C
	時間（用量設定試験）	48 時間
	時間（本試験、確認試験）	48.5 時間

8. コロニー計測の方法

計測方法	<input type="checkbox"/> 1. マニュアル計測 <input checked="" type="checkbox"/> 2. 機器計測
補正の有無	1 無 <input checked="" type="checkbox"/> 2. 有（補正の方法 面積補正）

9. 試験の結果

(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別表 1 に、本試験の結果を別表 2 に、確認試験の結果を別表 3 に、比活性値を別表 4 に示した。なお、図 1~10 は別表 2 より、図 11 は別表 3 より作成した。また、当該試験の参考データとして参照した背景データを Attachment として添付した。</p> <p>用量設定試験、本試験ともに代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA98、TA1537 において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の用量依存的な増加を示し、再現性も認められた。また、代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 においても復帰変異コロニー数の増加が認められ、最大で陰性対照値の約 1.9 倍の増加を示した。代謝活性化しない場合のすべての菌株及び代謝活性化した場合のその他の菌株においては、用量設定試験及び本試験ともに、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。なお、最大比活性値は、用量設定試験の代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA98 の 78.1 µg/plate における 5.63×10^2 (Rev/mg) であった。</p> <p>一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下において 2-アミノ-5-N, N-ジエチルアミノトルエンは、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した。</p>		

(3) 参考事項

本被験物質による沈殿は、代謝活性化しない場合の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 1000 µg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質による菌に対する生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 156 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 625 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100 の 750 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 1250 µg/plate 以上の用量で認められた。

本試験の試験用量は、生育阻害の認められた最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株は 313 µg/plate、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合のすべての菌株は 1250 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量（代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA98 及び TA1537 においては、最大比活性値が得られる用量を兼ねた）を設定した。

代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100 においては、復帰変異コロニー数の増加が認められた 1250 µg/plate を最高用量として以下公差 250 µg/plate で 4 段階希釈した計 5 用量で本試験より細かな用量域で確認試験を実施した。

被験液の調製及び試験操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

被験液の調製において、本被験物質の純度が 95 % であるため、秤量値に換算係数 0.95 として乗じた換算重量にて最高濃度を調製した。

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: 2-アミノ-5-N, N-ジエチルアミノトルエン

No. T-3089

試験実施期間		2019年12月25日 より 2019年12月28日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	99 109 (104)	9 11 (10)	24 22 (23)	20 26 (23)	7 9 (8)	
	1.22	111 98 (105)	15 13 (14)	22 25 (24)	18 15 (17)	8 9 (9)	
	4.88	91 88 (90)	11 16 (14)	18 17 (18)	16 13 (15)	4 8 (6)	
	19.5	126 95 (111)	10 13 (12)	16 22 (19)	16 11 (14)	4 8 (6)	
	78.1	121 143 (132)	11 12 (12)	23 16 (20)	17 16 (17)	6 7 (7)	
	313	89 * 75 * (82)	0 * 0 * (0)	19 18 (19)	15 * 14 * (15)	0 * 0 * (0)	
	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)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	106 109 (108)	8 11 (10)	26 25 (26)	31 29 (30)	9 7 (8)
		1.22	99 98 (99)	11 12 (12)	22 16 (19)	21 35 (28)	6 7 (7)
4.88		121 115 (118)	14 15 (15)	16 20 (18)	18 28 (23)	7 3 (5)	
19.5		116 123 (120)	13 13 (13)	17 19 (18)	36 26 (31)	6 4 (5)	
78.1		110 115 (113)	13 15 (14)	16 28 (22)	60 87 (74)	10 8 (9)	
313		162 150 (156)	14 16 (15)	15 18 (17)	132 110 (121)	25 14 (20)	
1250 #		4 * 2 * (3)	0 * 0 * (0)	16 * 23 * (20)	46 * 57 * (52)	0 * 0 * (0)	
5000 #		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	685 684 (685)	312 368 (340)	144 128 (136)	376 293 (335)	1269 1091 (1180)	
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
S9Mixを必要とするもの	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
	コロニー数/プレート	1060 1246 (1153)	229 244 (237)	634 611 (623)	301 321 (311)	97 73 (85)	

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ : アジ化ナトリウム
ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

: 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称：2-アミノ-5-N, N-ジエチルアミノトルエン

No. T-3089

試験実施期間		2020年1月7日 より 2020年1月10日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	95 110 (103)	8 5 (7)	26 27 (27)	19 27 (23)	4 6 (5)	
	9.77	113 87 (100)	6 5 (6)	NT	24 20 (22)	8 4 (6)	
	19.5	103 104 (104)	7 8 (8)	NT	25 15 (20)	4 7 (6)	
	39.1	122 92 (107)	5 5 (5)	17 22 (20)	11 19 (15)	7 4 (6)	
	78.1	111 106 (109)	7 2 (5)	22 27 (25)	21 23 (22)	5 6 (6)	
	156	143 151 (147)	5 * 6 * (6)	28 17 (23)	29 22 (26)	10 * 4 * (7)	
	313	90 * 72 * (81)	0 * 1 * (1)	23 28 (26)	32 * 31 * (32)	3 * 1 * (2)	
	625	NT	NT	28 * 26 * (27)	NT	NT	
	1250 #	NT	NT	4 * 2 * (3)	NT	NT	
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	117 114 (116)	9 7 (8)	43 29 (36)	38 35 (37)	6 5 (6)
		39.1	150 144 (147)	6 7 (7)	33 27 (30)	54 49 (52)	5 5 (5)
78.1		161 142 (152)	9 12 (11)	23 28 (26)	75 70 (73)	10 10 (10)	
156		171 159 (165)	13 9 (11)	27 33 (30)	123 100 (112)	19 10 (15)	
313		208 204 (206)	11 11 (11)	39 24 (32)	145 161 (153)	23 25 (24)	
625		238 210 (224)	9 * 7 * (8)	26 26 (26)	123 125 (124)	27 * 13 * (20)	
1250 #		167 * 170 * (169)	0 * 0 * (0)	19 * 33 * (26)	49 * 40 * (45)	0 * 0 * (0)	
名称		AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191	
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	777 737 (757)	221 194 (208)	143 147 (145)	465 482 (474)	1615 1456 (1536)	
	S9Mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
コロニー数/プレート	1197 1276 (1237)	210 201 (206)	508 733 (621)	296 281 (289)	92 105 (99)		

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ : アジ化ナトリウム
ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

: 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

NT : 試験せず。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表3)

試験結果表 (確認試験)

被験物質の名称 : 2-アミノ-5-N, N-
ジエチルアミノトルエン

No. T-3089

試験実施期間		2020年1月14日 より 2020年1月17日		
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)		
		塩基対置換型 TA100		
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	91		
		104	(98)	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	108		
		117	(113)	
	250	160		
	184	(172)		
	500	190		
	204	(197)		
	750	171 *		
189 *	(180)			
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	50 *		
		51 *	(51)	
		0 *		
陽性対照	S9Mixを必要とするもの	0 *	(0)	
		名 称		
		AF-2		
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)			
	0.01			
	コロニー数/プレート			
541				
521		(531)		
名 称		B[a]P		
用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)		5.0		
コロニー数/プレート		1095		
		1201		(1148)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)

アクリルアミド

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す

: 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表4)

比 活 性

被験物質の名称：2-アミノ-5-N, N-ジエチルアミノトルエン

No. T-3089

	菌株名	-S9Mix		+S9Mix	
		比活性	計算に使用した用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	比活性	計算に使用した用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
用量 設定 試験	TA100				
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98			5.63×10^2	78.1
	TA1537			3.83×10^1	313
本 試 験	TA100				
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98			4.81×10^2	156
	TA1537			5.77×10^1	156
確 認 試 験	TA100				

図 1

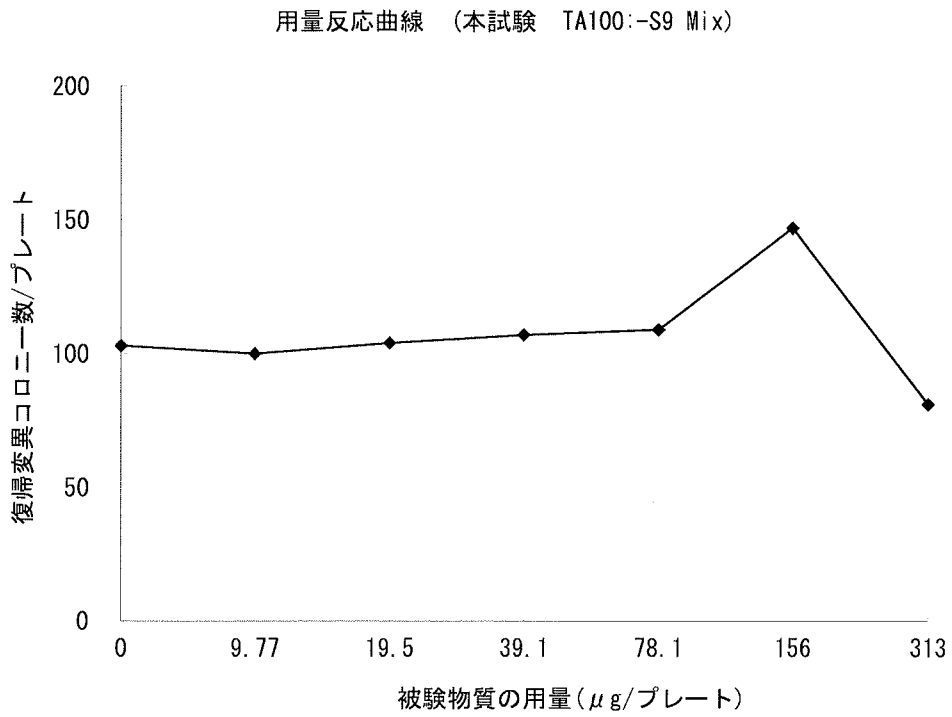


図 2

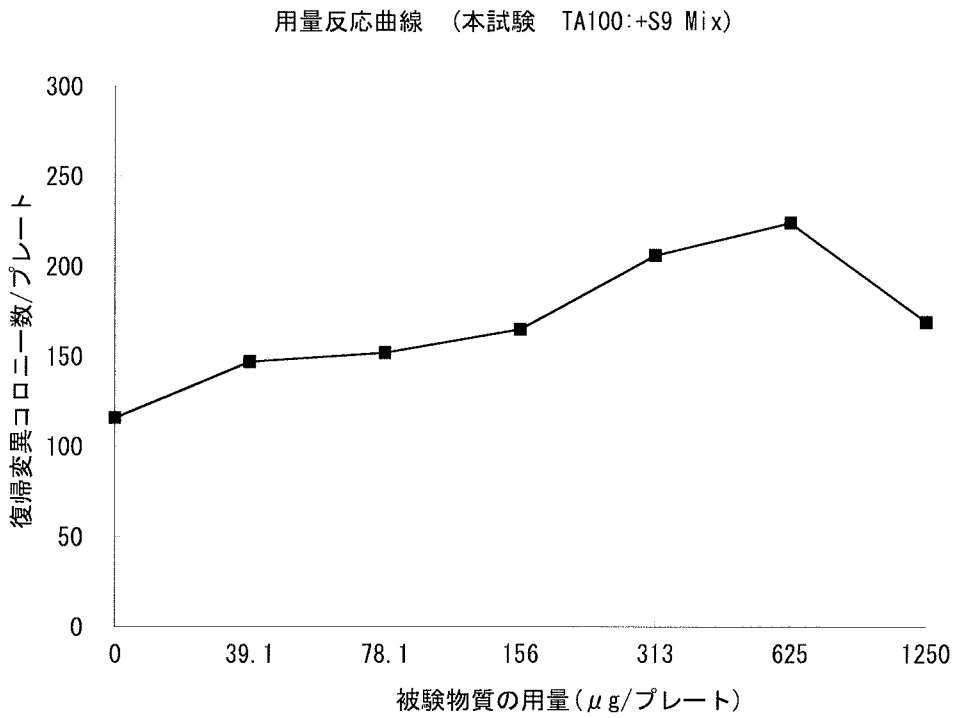


図 3

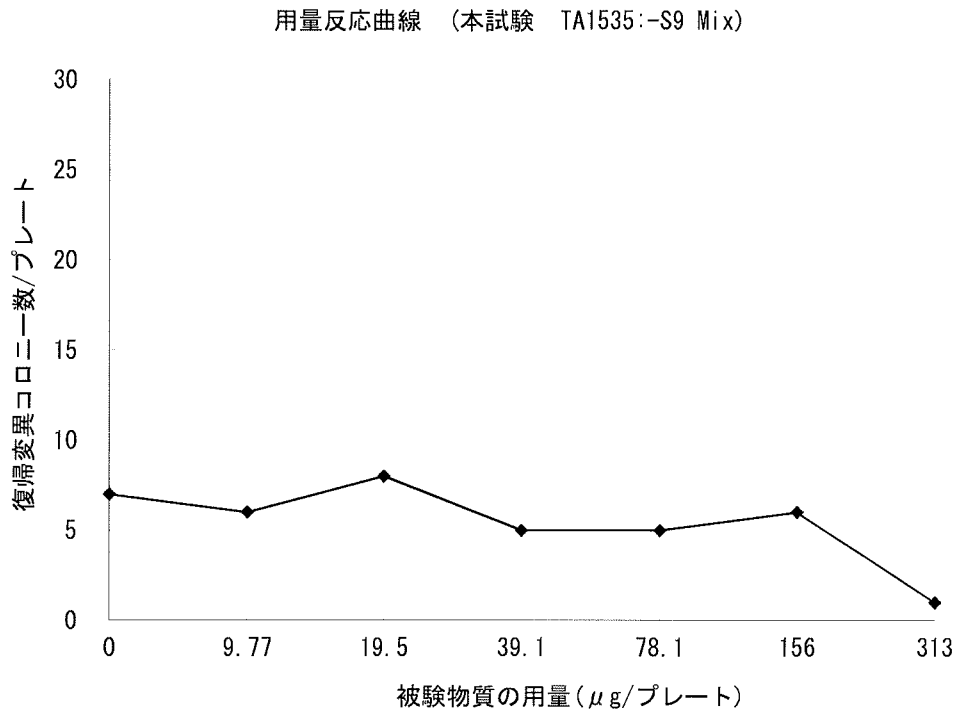


図 4

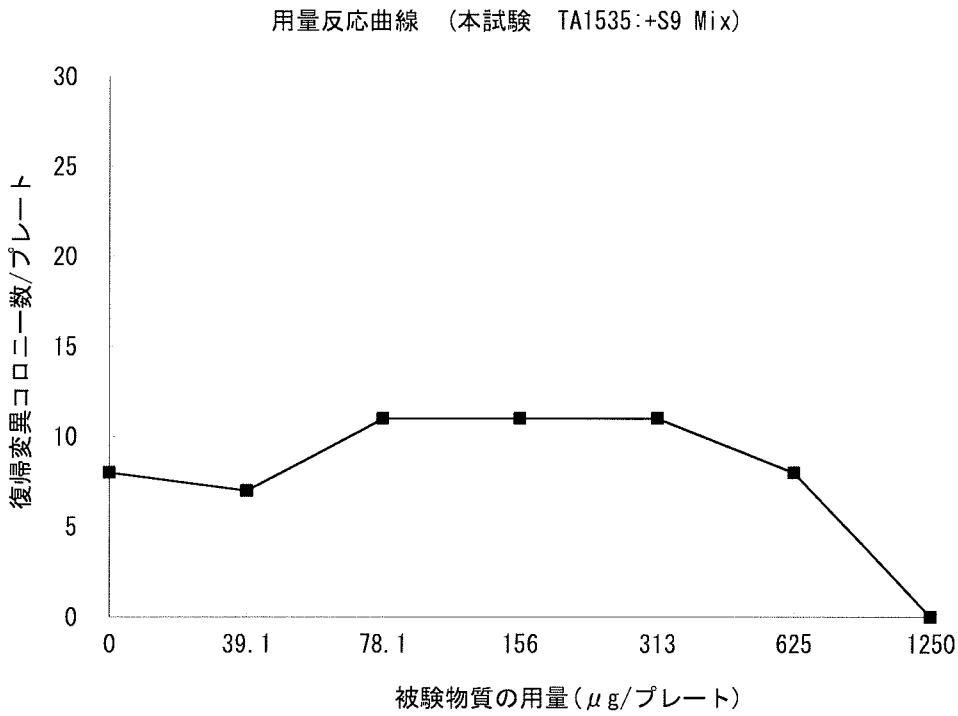


図 5

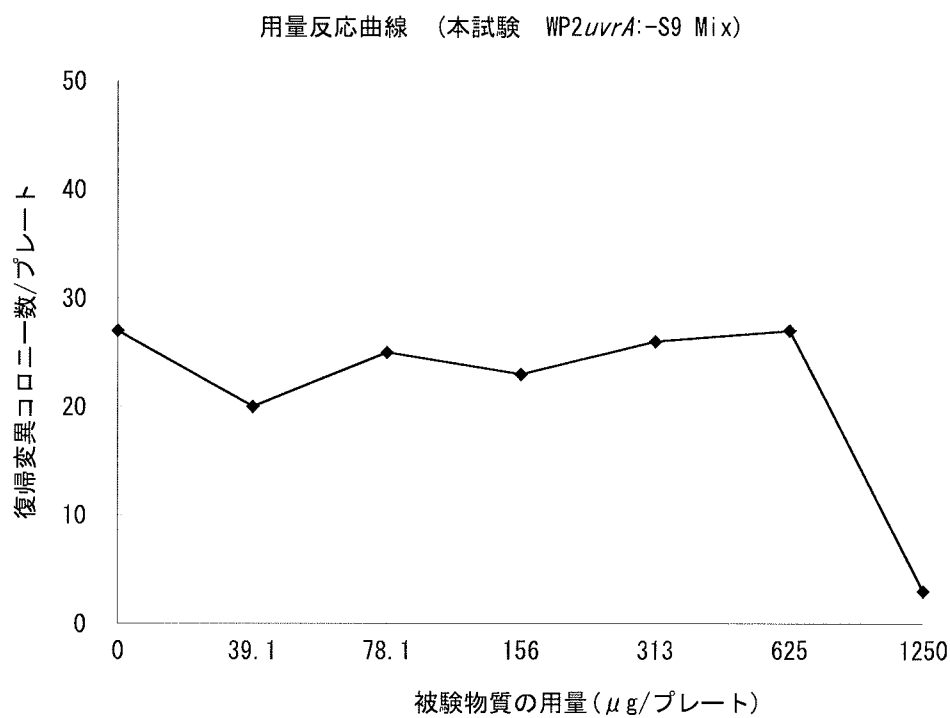


図 6

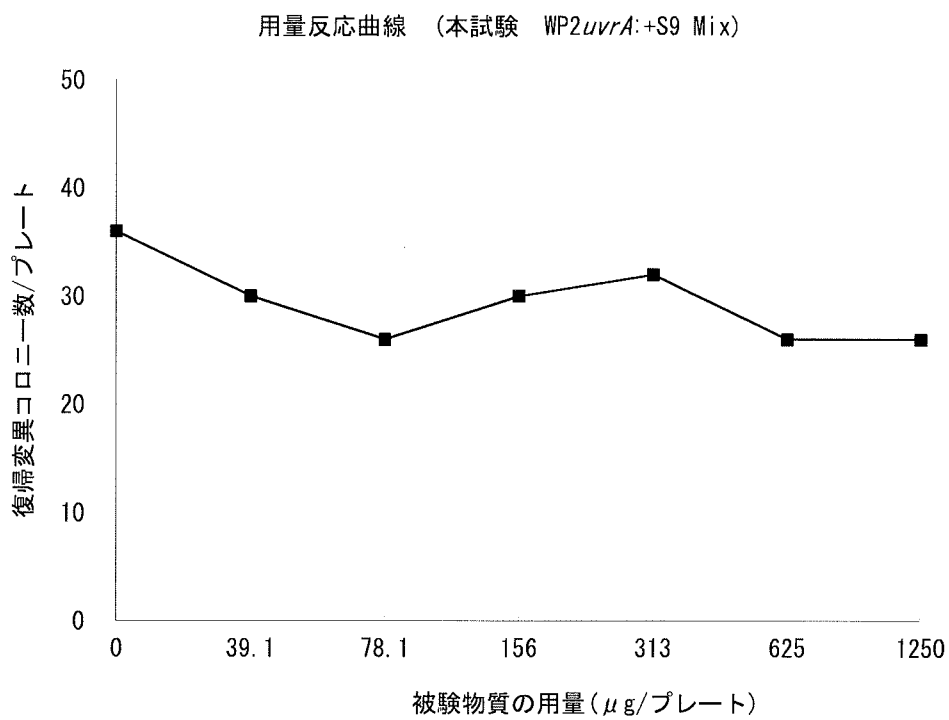


図 7

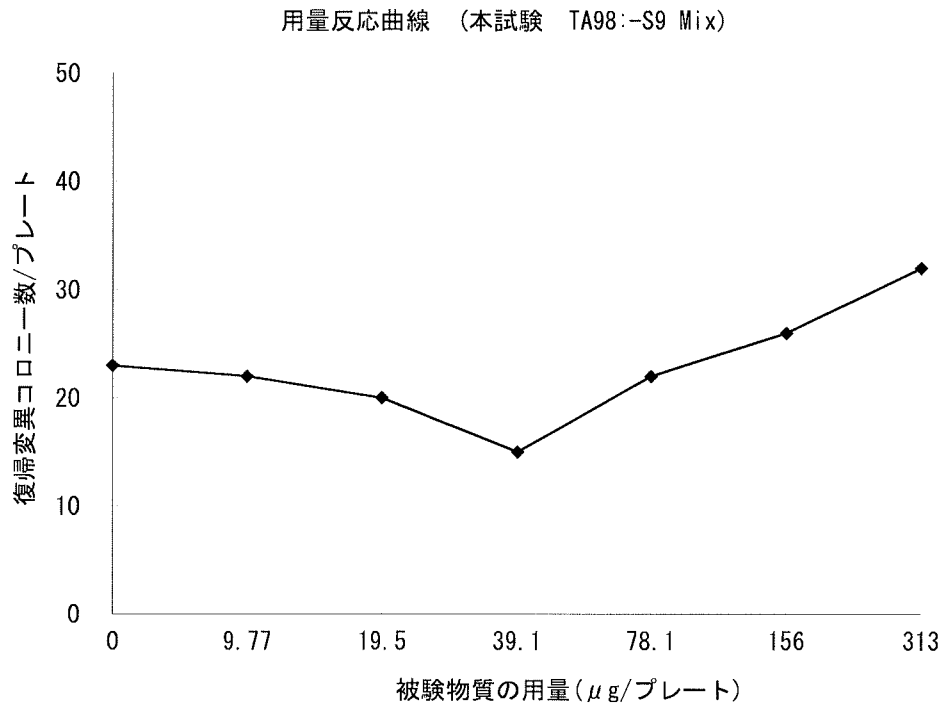


図 8

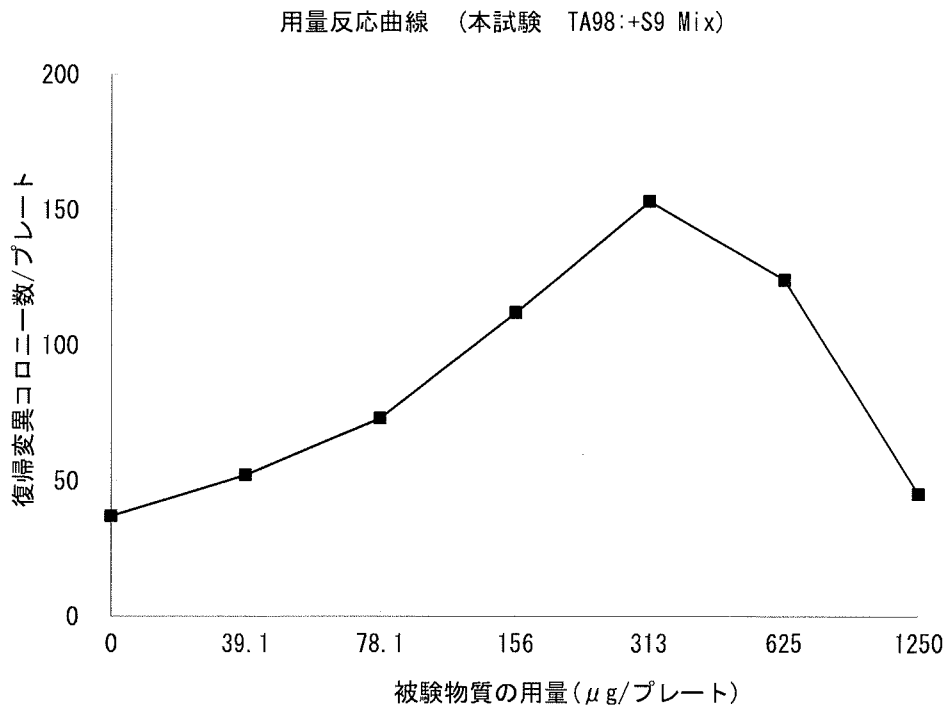


図 9

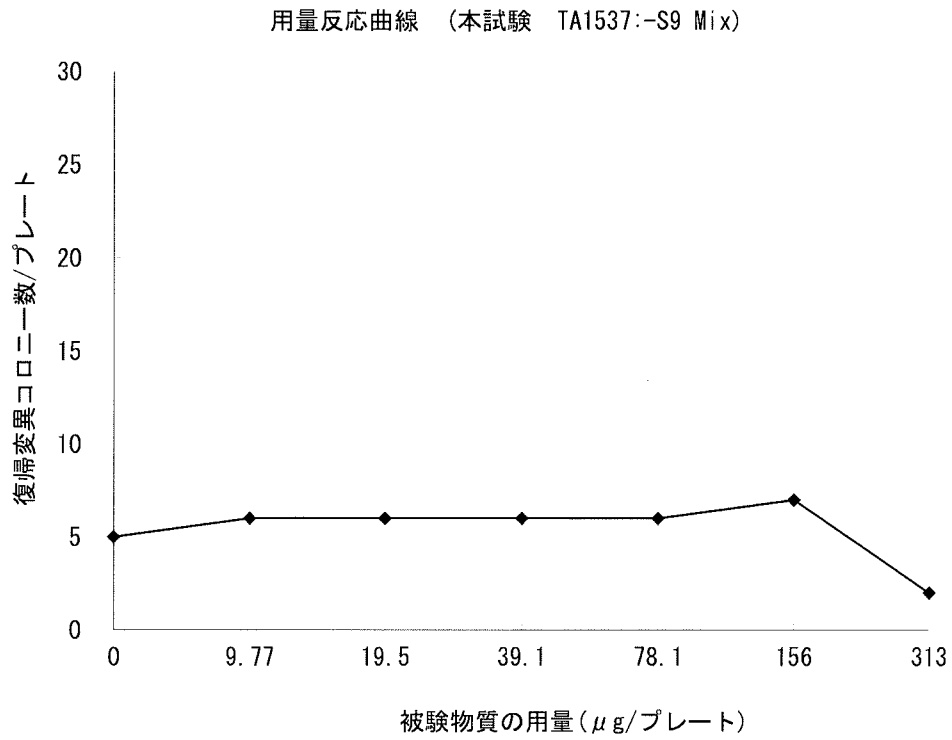


図 10

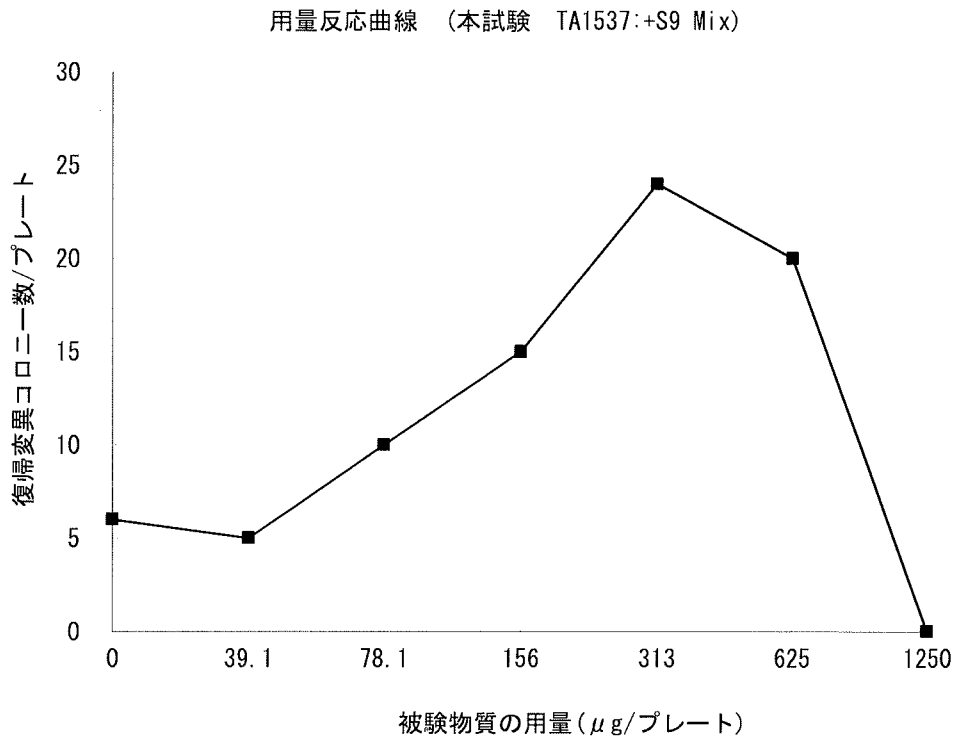
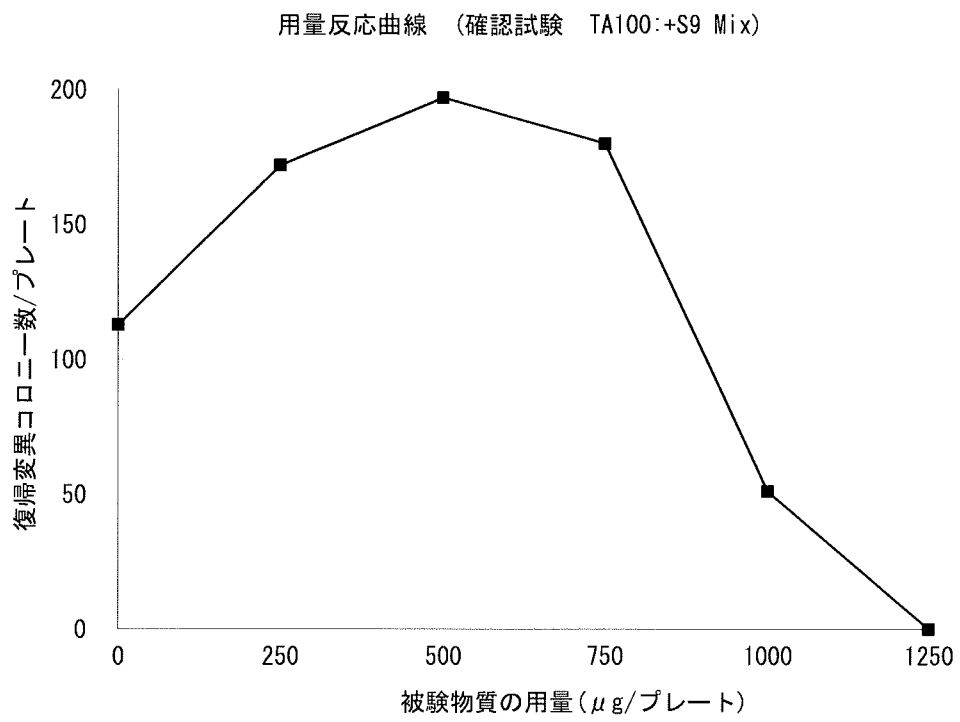


図 11



Background Data

Test Category : Bacterial reverse mutation test (Preincubation Method)

CODE No. : 190924

Period : From September 20, 2019 to September 24, 2019

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	107	13	69	146	20
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	565	87	302	827	20
	+	Solvent control	121	11	87	154	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	977	90	708	1247	20
TA1535	-	Solvent control	10	4	1	20	20
		Positive control SAZ (0.5 µg/plate)	305	44	174	437	20
	+	Solvent control	10	3	1	20	20
		Positive control 2AA (2.0 µg/plate)	231	28	146	316	20
WP2uvrA	-	Solvent control	29	7	9	49	20
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	101	21	38	164	20
	+	Solvent control	30	7	9	52	20
		Positive control 2AA (10.0 µg/plate)	611	84	358	864	20
TA98	-	Solvent control	26	5	11	42	20
		Positive control AF-2 (0.1 µg/plate)	399	32	304	495	20
	+	Solvent control	37	7	16	57	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	282	22	218	347	20
TA1537	-	Solvent control	7	4	1	18	20
		Positive control ICR-191 (1.0 µg/plate)	1406	267	605	2208	20
	+	Solvent control	10	3	2	18	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	83	12	47	119	20

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethyl sulfoxide(DMSO)

Positive controls AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

SAZ : Sodium azide

ICR-191 : 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl

B[a]P : Benzo[a]pyrene

2AA : 2-Aminoanthracene

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation