

# 最 終 報 告 書

2, 4-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 : 01-169)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

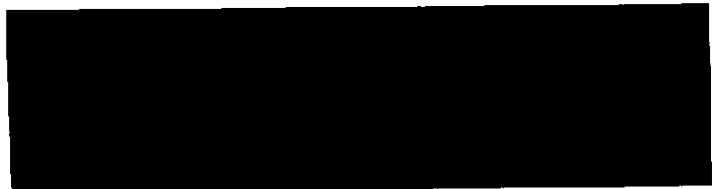
## 陳 述 書

試験表題： 2, 4-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： 01-169

本試験は、OECD の試験法ガイドライン“OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 471, Bacterial Reverse Mutation Test(1997)” および OECD の GLP “OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(1997)” に定める基準に準拠して実施した。

試験責任者



試験表題： 2, 4-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： 01-169

試験委託者：

名 称 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター

所 在 地 東京都渋谷区西原 2-49-10

委託責任者

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所

所 在 地 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11

運営管理者

試験責任者

信頼性保証

責 任 者

試験期間：

試験開始日 平成 13 年 12 月 21 日

実験期間 開始日：平成 14 年 1 月 8 日

終了日：平成 14 年 1 月 24 日

試験終了日 平成 14 年 3 月 20 日

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因：

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は，最終報告書作成後 10 年間，財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については，試験委託者と協議して決める。

- 1．試験計画書
- 2．被験物質に関する記録
- 3．試験結果に関する記録
- 4．信頼性保証に関する記録
- 5．最終報告書

試験責任者，担当者および業務分担

試験責任者

試験担当者およびその業務分担

実験操作

データ整理：

## 目 次

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

表：

表1-1 S9 mix 非存在下における 2, 4-ジメチルアニリン の復帰突然変異試験結果【本試験 1 回目-直接法】 .....	11
表1-2 S9 mix 存在下における 2, 4-ジメチルアニリン の復帰突然変異試験結果【本試験 1 回目-代謝活性化法】 .....	12

表 2-1	S9 mix 非存在下における 2, 4-ジメチルアニリン の復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-直接法] .....	13
表 2-2	S9 mix 存在下における 2, 4-ジメチルアニリン の復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-代謝活性化法] .....	14
図 :		
図 1	2, 4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目 ....	15
図 2	2, 4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目 ....	19
添付資料	復帰変異コロニー数-背景データ .....	23

## 要 約

2, 4-ジメチルアニリンの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、復帰突然変異試験を指標菌株として *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。

用量は、用量設定試験（予備試験）の結果、菌の生育阻害が認められた用量を最高用量とし、直接法の場合は、TA98, TA100, TA1535 および WP2uvrA では 78.1～2500  $\mu\text{g}$ /プレート、TA1537 では 39.1～1250  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲（公比 2）で、また、代謝活性化法の場合は、*S. typhimurium* では 78.1～2500  $\mu\text{g}$ /プレート、*E. coli* では 156～5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲（公比 2）で設定した。

試験は 2 回実施した。その結果、直接法の場合は、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、代謝活性化法の場合は、TA100 で用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、すべての用量で陰性対照値の 2 倍を超える増加が認められた。菌の生育阻害については、直接法および代謝活性化法のいずれの菌株とも最高用量において認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、2, 4-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。また、本被験物質の比変異活性値は、2202.3 /mg であった。

## 試験目的

この試験は、2, 4-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 : 2, 4-ジメチルアニリン

別 名 : 2, 4-キシリジン

CAS番号 : 95-68-1

ロット番号 : [REDACTED]

純 度 : 99.1% (平成 13 年 10 月 2 日, [REDACTED] に  
おいて分析)

入手先(製造元) : [REDACTED]

### の試薬

入 手 日 : 平成 13 年 9 月 27 日

入 手 量 : 50 mL

物 性 等 :

化学名 2, 4-ジメチルアニリン (2, 4-Dimethylaniline)

分子式  $C_8H_{11}N$

分子量 121.18

性状(常温) 微黄色透明液体

融点  $14^{\circ}C$

比重 0.98

沸点  $214^{\circ}C$

蒸気圧 133Pa/ $52.6^{\circ}C$

溶解性 油溶性 (水に難溶, アルコール, エーテル, ベンゼンに可溶)

安 定 性 : 安定 [実験終了後, 残余被験物質を [REDACTED]  
[REDACTED] において分析 (GC 法, 平成 14 年 2 月 5 日) した結果, 純度は  
1 回目測定 : 98.9%, 2 回目測定 : 98.8% 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

指標菌株は, 国立公衆衛生院より入手 (平成6年12月19日) した以下の5種類を用いた。

---

(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

---

## 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, 和光純薬工業株式会社, ロット番号 DLH7740, 99.9%) を 0.07 mL の割合で加えて -80℃ 以下で保存した。この保存菌株の 25 μL 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 15 mL に接種し, 37℃ で 12 時間振盪培養した。培養後の懸濁菌液については, 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により 1 mL あたり  $1 \times 10^9$  以上の生菌数が得られていることを確認した。

生菌数 ( $\times 10^9/\text{mL}$ )

指標菌株	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	1.50	1.72	1.30	1.41	1.21
本試験(1回目)	1.50	1.62	1.38	1.33	1.14
本試験(2回目)	1.50	1.62	1.30	1.41	1.21

## 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 (用量設定試験：ロット番号 FSM-449・2001 年 8 月 10 日製造・2001 年 8 月 28 日購入，本試験：ロット番号 FSM-455・2001 年 11 月 22 日製造・2001 年 12 月 7 日購入)。凍結 S9 mix は  $-80^{\circ}\text{C}$  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 あたりの組成は、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： 203~246 g (FSM-449), 204~232 g (FSM-455)

#### 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 ( $9000 \times g$ ) し、その上清を採取

### S9 mix 1 mL 当たりの組成

MgCl <sub>2</sub>	8	$\mu\text{mol}$
KCl	33	$\mu\text{mol}$
G-6-P	.5	$\mu\text{mol}$
NADH	4	$\mu\text{mol}$
NADPH	4	$\mu\text{mol}$
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	100	$\mu\text{mol}$
S9	0.1	mL

## 6. 被験物質の供試液の調製

被験物質は水に難溶であり、予備的検討の結果、DMSO に可溶であったため、溶媒には DMSO (和光純薬工業株式会社, ロット番号 DWH7397, 100%) 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。溶媒を用いて最高用量の供試液 (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用量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) には、被験物質用の溶媒である DMSO を用いた。陽性対照としては、以下の既知変異原物質を用いた。

AF-2 および 2-AA は DMSO (和光純薬工業株式会社, ロット番号 ELE7866・99.9%, DWH7397・100%) 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 KOG81, 局方) に溶解した。

指標菌株	直接法 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	代謝活性化法 ( $\mu\text{g}$ /プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	SA (0.5)	2-AA (2)
WP2 <sub>uvrA</sub>	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 KCM2259)

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 07721MZ)

## 8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6w/v%粉末寒天 (Difco Laboratories, ロット番号 132695XA) および 0.5w/v% 塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社, ロット番号 7001) 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 (Sigma Chemical Company, ロット番号 39H0679) および 0.5 mM L-ヒスチジン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 DLJ5479) 水溶液, *E. coli* 用には 0.5 mM L-トリブ

トファン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 KCK3898）水溶液を 1/10 容加え，アミノ酸添加軟寒天培地とした。

#### 9. 用量設定試験（予備試験）

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために，全指標菌株について，39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000  $\mu\text{g}$ /プレートの 8 用量を用いて，本試験と同様の実験方法で試験を行った。試験は各用量 1 枚のプレートで行った。

その結果，直接法の場合は，TA1537 の 1250  $\mu\text{g}$ /プレート以上，TA100, TA1535, TA98 および WP2uvrA の 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で，また，代謝活性化法の場合は，TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上，WP2uvrA の 5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で菌の生育阻害が認められた。

#### 10. 本試験

本試験は，同一菌株，同一用量で 2 回行った。

##### 1) 用量設定

用量設定試験の結果から，被験物質の用量は，直接法の場合は，TA1537 では 1250  $\mu\text{g}$ /プレートを最高用量とし，以下公比 2 で 625, 313, 156, 78.1 および 39.1  $\mu\text{g}$ /プレート，TA98, TA100, TA1535 および WPuvrA では 2500  $\mu\text{g}$ /プレートを最高用量とし，以下公比 2 で 1250, 625, 313, 156 および 78.1  $\mu\text{g}$ /プレートのそれぞれ計 6 用量とした。代謝活性化法の場合は，TA98, TA100, TA1535 および TA1537 では 2500  $\mu\text{g}$ /プレートを最高用量とし，以下公比 2 で 1250, 625, 313, 156 および 78.1  $\mu\text{g}$ /プレート，WPuvrA では 5000  $\mu\text{g}$ /プレートを最高用量とし，以下公比 2 で 2500, 1250, 625, 313 および 156  $\mu\text{g}$ /プレートのそれぞれ計 6 用量とした。

##### 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懸濁菌液 0.1 mL，被験物質の供試液 0.1 mL および 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）0.5 mL（和光純薬工業株式会社，リン酸水素二ナトリウム・十二水塩：ロット番号 CAH3075，リン酸二水素ナトリウム・二水塩：ロット番号 CAJ2723）を分注し，37℃で 20 分間振盪培養後，45℃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，用量設定試験：ロット番号 ANI460GQ・2001 年 7 月 17 日製造・2001 年 8 月 27 日購入，本試験：ロット番号 ANI630IQ・2001 年 9 月 28 日製造・2001 年 11 月 29 日購入）は，Vogel-Bonner E 培地（0.2w/v%クエン酸・一水塩，1w/v%リン酸二カリウム，0.192w/v%リン酸一アンモニウム，0.066w/v%水酸化ナトリウム，0.02w/v%硫酸マグネシウム・七水塩）に寒天粉末を 1.5w/v%およびグルコースを 2w/v%となるように加え，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（DMSO）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。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

## (2) ブレインキューベーション法（代謝活性化法）

滅菌小試験管に前培養した懸濁菌液 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（DMSO）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。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

## 11. 無菌試験

用量設定試験および本試験において，用いた溶媒，S9 mix および最高用量の被験物質の供試液について，それぞれ 0.1 mL に 0.6w/v%軟寒天培地 2 mL を加え，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，用量設定試験：ロット番号 ANI460GQ，本試験：ロット番号 ANI630IQ）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、試験は有効であると判定した。

- (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、当研究所における陽性対照値の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、各用量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、原則的に以下の 3 基準を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 倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
  - (2) 被験物質用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する（用量依存性）。
  - (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。
- 但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定した。

## 結 果

試験を 2 回実施した結果（表 1・1, 1・2, 2・1, 2・2 および図 1・1, 1・2, 1・3, 1・4, 2・1, 2・2, 2・3, 2・4）、直接法の場合は、供試したすべての菌株において復帰変異コロニー数は、陰性対照値の 2 倍を超えることはなかった。代謝活性化法の場合は、TA100 で用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、すべての用量で陰性対照値の 2 倍を超える増加が認められた。その他の菌株では、陰性対照値の 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。菌の生育阻害については、直接法および代謝活性化法ともにいずれの菌株とも最高用量において認められた。

陰性対照値の 2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加が認められた TA100 について、

比変異活性値（比活性）<sup>3)</sup>を算出した（陰性対照値の2倍を超える復帰変異コロニー数の増加が認められた用量について、その復帰変異コロニー数の平均値から陰性対照のコロニー数の平均値を差し引いた値を用量で除して求めた。誘発復帰変異コロニー数/mg）。結果は下表のとおりであった。

（本試験1回目）

菌株名	比変異活性値 (誘発復帰変異コロニー数/mg)	計算に用いた用量 ( $\mu$ g/プレート)
TA100	1831.0	78.1
	1153.8	156
	680.5	313
	387.2	625
	214.4	1250
	58.0	2500

（本試験2回目）

菌株名	比変異活性値 (誘発復帰変異コロニー数/mg)	計算に用いた用量 ( $\mu$ g/プレート)
TA100	2202.3	78.1
	1307.7	156
	824.3	313
	456.0	625
	222.4	1250
	118.4	2500

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た。陽性対照群においては明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められ、その程度は、それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性値を示すものであった。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。その他、実験中、被験物質の析出等、特記すべき変化は認められなかった。

## 結 論

2, 4-ジメチルアニリンについて遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。その結果、2 回の本試験とも代謝活性化法における TA100 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、2 回にわたる本試験ともに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2,4-ジメチルアニリンの遺伝子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最も高い値を示した 2202.3/mg を採用した。

#### 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., Nicols, W. and Ramel, C., Elsevier, 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 改訂版", 化学工業日報社, 東京, 1992, p. 47.



表 1-1 S9 mix 非存在下における 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果  
〔本試験1回目－直接法〕

用 量 〔 $\mu$ g/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	93	7	18	24	12
[ジメチル スルホキシド]	98	7	10	31	3
	103	6	23	34	10
	( 98 $\pm$ 5 )	( 7 $\pm$ 1 )	( 17 $\pm$ 7 )	( 30 $\pm$ 5 )	( 8 $\pm$ 5 )
39 .1	--	--	--	--	6
	--	--	--	--	10
	--	--	--	--	9
	--	--	--	--	( 8 $\pm$ 2 )
78 .1	93	7	14	20	10
	99	9	14	23	6
	92	7	13	20	9
	( 95 $\pm$ 4 )	( 8 $\pm$ 1 )	( 14 $\pm$ 1 )	( 21 $\pm$ 2 )	( 8 $\pm$ 2 )
156	118	5	13	20	11
	114	6	21	13	5
	92	8	21	18	6
	( 108 $\pm$ 14 )	( 6 $\pm$ 2 )	( 18 $\pm$ 5 )	( 17 $\pm$ 4 )	( 7 $\pm$ 3 )
313	117	6	12	25	6
	115	6	24	22	10
	119	5	14	20	8
	( 117 $\pm$ 2 )	( 6 $\pm$ 1 )	( 17 $\pm$ 6 )	( 22 $\pm$ 3 )	( 8 $\pm$ 2 )
625	121	7	18	21	14
	115	6	11	25	8
	126	10	11	29	3
	( 121 $\pm$ 6 )	( 8 $\pm$ 2 )	( 13 $\pm$ 4 )	( 25 $\pm$ 4 )	( 8 $\pm$ 6 )
1250	155	5	19	21	14 *
	142	12	8	14	9 *
	142	7	18	23	6 *
	( 146 $\pm$ 8 )	( 8 $\pm$ 4 )	( 15 $\pm$ 6 )	( 19 $\pm$ 5 )	( 10 $\pm$ 4 )
2500	117 *	4 *	12 *	7 *	--
	114 *	2 *	15 *	12 *	--
	110 *	6 *	15 *	12 *	--
	( 114 $\pm$ 4 )	( 4 $\pm$ 2 )	( 14 $\pm$ 2 )	( 10 $\pm$ 3 )	--
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	779	373	908	473	268
コロニー数	660	371	863	457	270
/プレート	738	349	899	472	317
	( 726 $\pm$ 60 )	( 364 $\pm$ 13 )	( 890 $\pm$ 24 )	( 467 $\pm$ 9 )	( 285 $\pm$ 28 )

( ) : 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた

-- : 検査せず

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 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果  
〔本試験1回目－代謝活性化法〕

用 量 〔 $\mu$ g/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	99	8	15	21	9
[ジメチル スルホキシド]	121	10	25	32	12
	120	8	17	27	13
	( 113 $\pm$ 12 )	( 9 $\pm$ 1 )	( 19 $\pm$ 5 )	( 27 $\pm$ 6 )	( 11 $\pm$ 2 )
78 .1	250	9	—	37	11
	266	7	—	42	8
	252	5	—	36	11
	( 256 $\pm$ 9 )	( 7 $\pm$ 2 )	—	( 38 $\pm$ 3 )	( 10 $\pm$ 2 )
156	294	9	25	37	8
	305	9	24	44	13
	281	12	27	50	12
	( 293 $\pm$ 12 )	( 10 $\pm$ 2 )	( 25 $\pm$ 2 )	( 44 $\pm$ 7 )	( 11 $\pm$ 3 )
313	305	16	25	46	9
	325	6	20	45	16
	348	9	16	38	10
	( 326 $\pm$ 22 )	( 10 $\pm$ 5 )	( 20 $\pm$ 5 )	( 43 $\pm$ 4 )	( 12 $\pm$ 4 )
625	382	8	27	44	9
	352	10	27	40	14
	332	12	22	35	8
	( 355 $\pm$ 25 )	( 10 $\pm$ 2 )	( 25 $\pm$ 3 )	( 40 $\pm$ 5 )	( 10 $\pm$ 3 )
1250	370	10	22	36	15
	372	8	23	41	13
	402	8	23	40	9
	( 381 $\pm$ 18 )	( 9 $\pm$ 1 )	( 23 $\pm$ 1 )	( 39 $\pm$ 3 )	( 12 $\pm$ 3 )
2500	254 *	5 *	17	42 *	5 *
	231 *	5 *	24	14 *	9 *
	290 *	3 *	16	33 *	10 *
	( 258 $\pm$ 30 )	( 4 $\pm$ 1 )	( 19 $\pm$ 4 )	( 30 $\pm$ 14 )	( 8 $\pm$ 3 )
5000	—	—	12 *	—	—
	—	—	7 *	—	—
	—	—	0 *	—	—
	—	—	( 6 $\pm$ 6 )	—	—
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
$\mu$ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	428	134	431	267	97
コロニー数	350	153	506	251	82
/プレート	358	148	495	247	94
	( 379 $\pm$ 43 )	( 145 $\pm$ 10 )	( 477 $\pm$ 41 )	( 255 $\pm$ 11 )	( 91 $\pm$ 8 )

( ) : 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた

— : 検査せず

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 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果  
[本試験2回目-直接法]

用 量 [ $\mu$ g/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	103	9	23	15	12
[ジメチル スルホキシド]	107	10	15	26	15
	129	10	17	22	7
	( 113 $\pm$ 14 )	( 10 $\pm$ 1 )	( 18 $\pm$ 4 )	( 21 $\pm$ 6 )	( 11 $\pm$ 4 )
39 .1	--	--	--	--	10
	--	--	--	--	7
	--	--	--	--	7
	--	--	--	--	( 8 $\pm$ 2 )
78 .1	100	8	16	16	10
	96	7	24	22	6
	96	6	15	33	5
	( 97 $\pm$ 2 )	( 7 $\pm$ 1 )	( 18 $\pm$ 5 )	( 24 $\pm$ 9 )	( 7 $\pm$ 3 )
156	97	11	15	24	12
	88	5	22	21	8
	88	9	19	27	7
	( 91 $\pm$ 5 )	( 8 $\pm$ 3 )	( 19 $\pm$ 4 )	( 24 $\pm$ 3 )	( 9 $\pm$ 3 )
313	100	8	13	25	10
	112	10	15	27	8
	144	6	20	20	7
	( 119 $\pm$ 23 )	( 8 $\pm$ 2 )	( 16 $\pm$ 4 )	( 24 $\pm$ 4 )	( 8 $\pm$ 2 )
625	119	10	11	33	11
	117	5	16	25	11
	105	6	16	15	15
	( 114 $\pm$ 8 )	( 7 $\pm$ 3 )	( 14 $\pm$ 3 )	( 24 $\pm$ 9 )	( 12 $\pm$ 2 )
1250	158	13	11	21	15 *
	146	10	13	28	9 *
	178	9	22	35	8 *
	( 161 $\pm$ 16 )	( 11 $\pm$ 2 )	( 15 $\pm$ 6 )	( 28 $\pm$ 7 )	( 11 $\pm$ 4 )
2500	141 *	12 *	17 *	23 *	--
	129 *	4 *	16 *	18 *	--
	139 *	5 *	16 *	27 *	--
	( 136 $\pm$ 6 )	( 7 $\pm$ 4 )	( 16 $\pm$ 1 )	( 23 $\pm$ 5 )	--
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	827	365	955	411	712
コロニー数	769	264	822	468	688
/プレート	823	346	835	407	724
	( 806 $\pm$ 32 )	( 325 $\pm$ 54 )	( 871 $\pm$ 73 )	( 429 $\pm$ 34 )	( 708 $\pm$ 18 )

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた

-- : 検査せず

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 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果  
[本試験2回目一代謝活性化法]

用 量 [ $\mu$ g/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	108	10	20	29	16
[ジメチル スルホキシド]	105	5	18	30	16
	116	11	26	22	15
	(110 $\pm$ 6)	(9 $\pm$ 3)	(21 $\pm$ 4)	(27 $\pm$ 4)	(16 $\pm$ 1)
78 .1	312	10	---	39	8
	258	9	---	39	10
	276	4	---	43	11
	(282 $\pm$ 27)	(8 $\pm$ 3)	---	(40 $\pm$ 2)	(10 $\pm$ 2)
156	337	11	31	36	7
	311	8	19	33	15
	295	9	20	39	10
	(314 $\pm$ 21)	(9 $\pm$ 2)	(23 $\pm$ 7)	(36 $\pm$ 3)	(11 $\pm$ 4)
313	356	8	23	42	17
	355	7	25	42	11
	392	9	14	39	14
	(368 $\pm$ 21)	(8 $\pm$ 1)	(21 $\pm$ 6)	(41 $\pm$ 2)	(14 $\pm$ 3)
625	403	13	16	40	7
	408	3	23	31	9
	375	11	25	41	10
	(395 $\pm$ 18)	(9 $\pm$ 5)	(21 $\pm$ 5)	(37 $\pm$ 6)	(9 $\pm$ 2)
1250	416	7	16	43	5
	372	5	19	38	8
	375	5	25	44	16
	(388 $\pm$ 25)	(6 $\pm$ 1)	(20 $\pm$ 5)	(42 $\pm$ 3)	(10 $\pm$ 6)
2500	387 *	13 *	22	41 *	19 *
	447 *	5 *	23	33 *	13 *
	383 *	10 *	25	52 *	17 *
	(406 $\pm$ 36)	(9 $\pm$ 4)	(23 $\pm$ 2)	(42 $\pm$ 10)	(16 $\pm$ 3)
5000	---	---	7 *	---	---
	---	---	2 *	---	---
	---	---	2 *	---	---
	---	---	(4 $\pm$ 3)	---	---
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
$\mu$ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	408	127	516	301	101
コロニー数	452	146	587	284	110
/プレート	444	118	556	279	73
	(435 $\pm$ 23)	(130 $\pm$ 14)	(553 $\pm$ 36)	(288 $\pm$ 12)	(95 $\pm$ 19)

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた

--- : 検査せず

2-AA: 2-アミノアントラセン

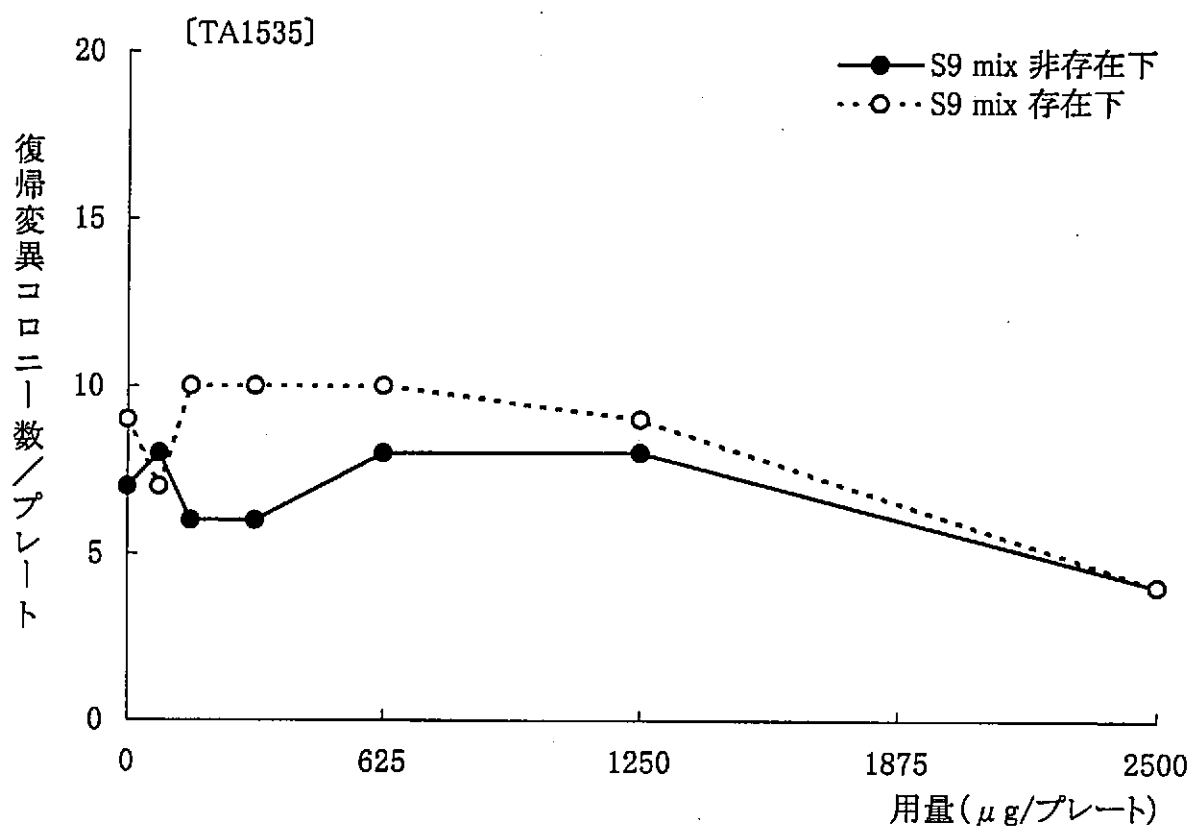
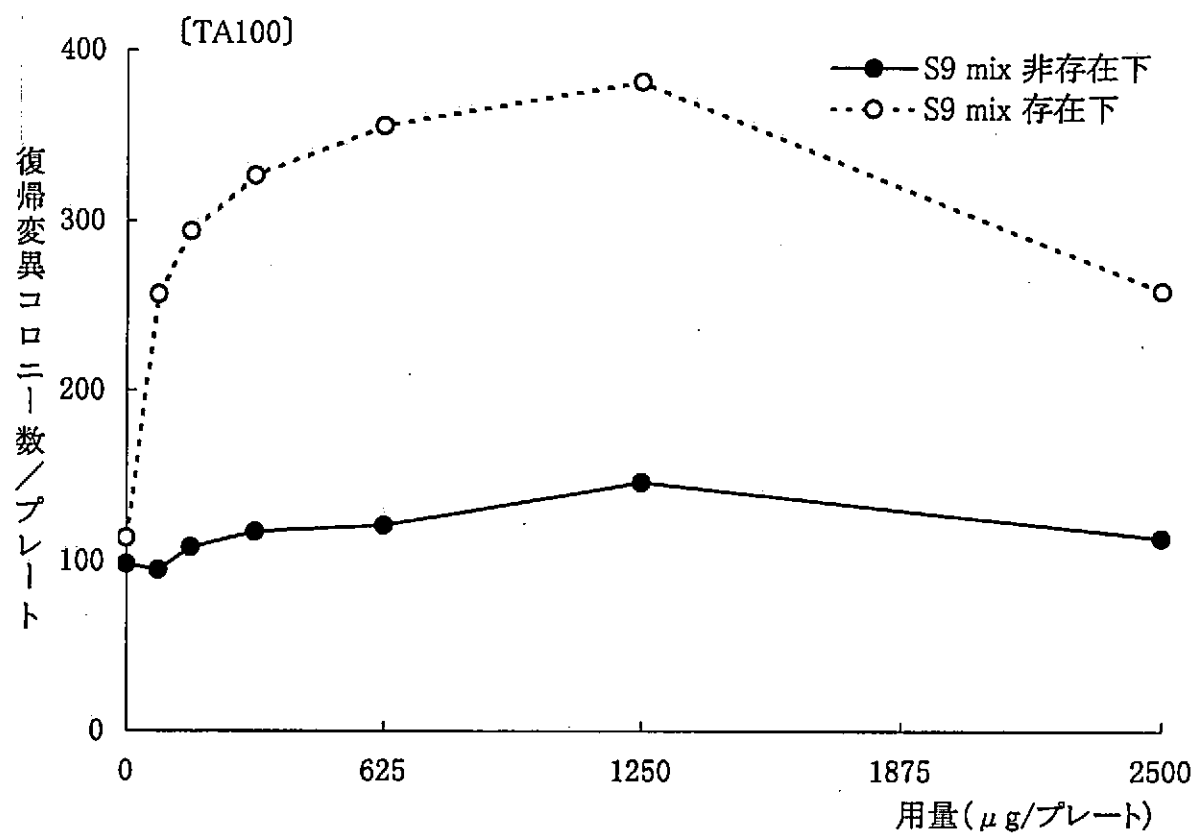


図 1-1 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

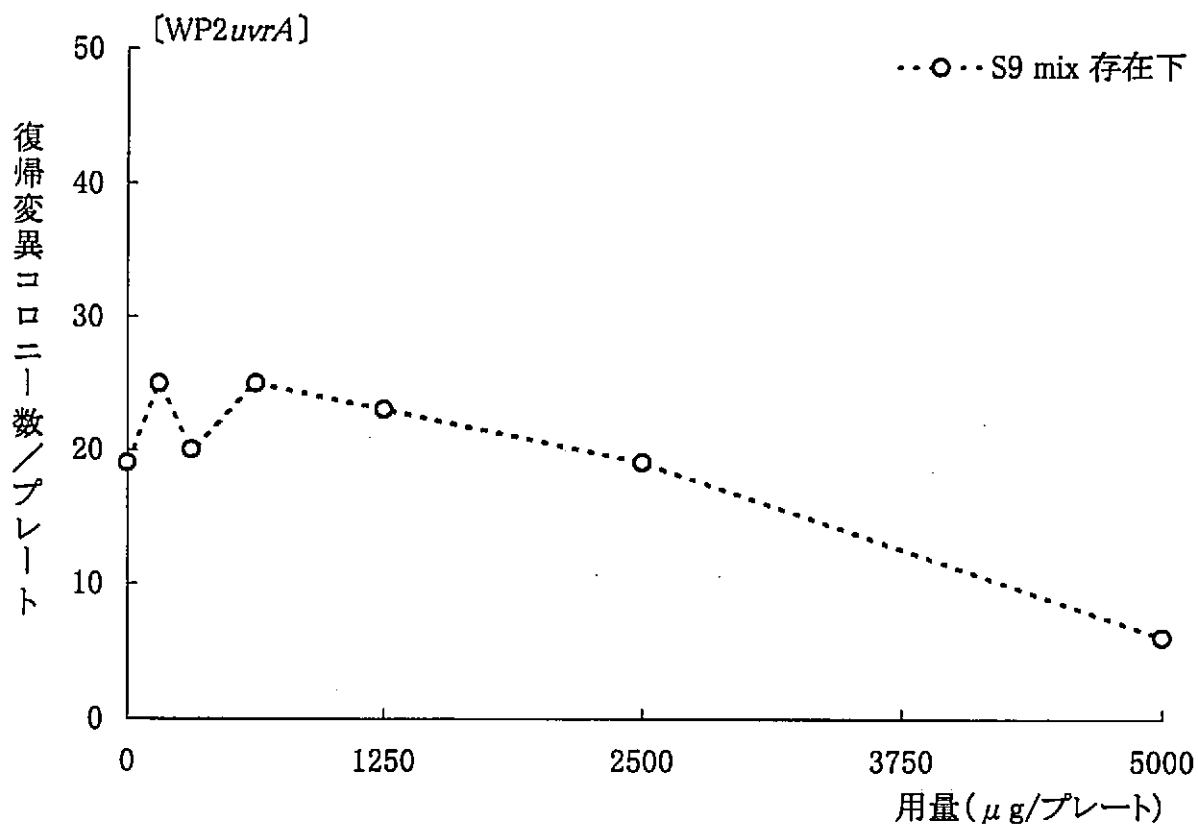
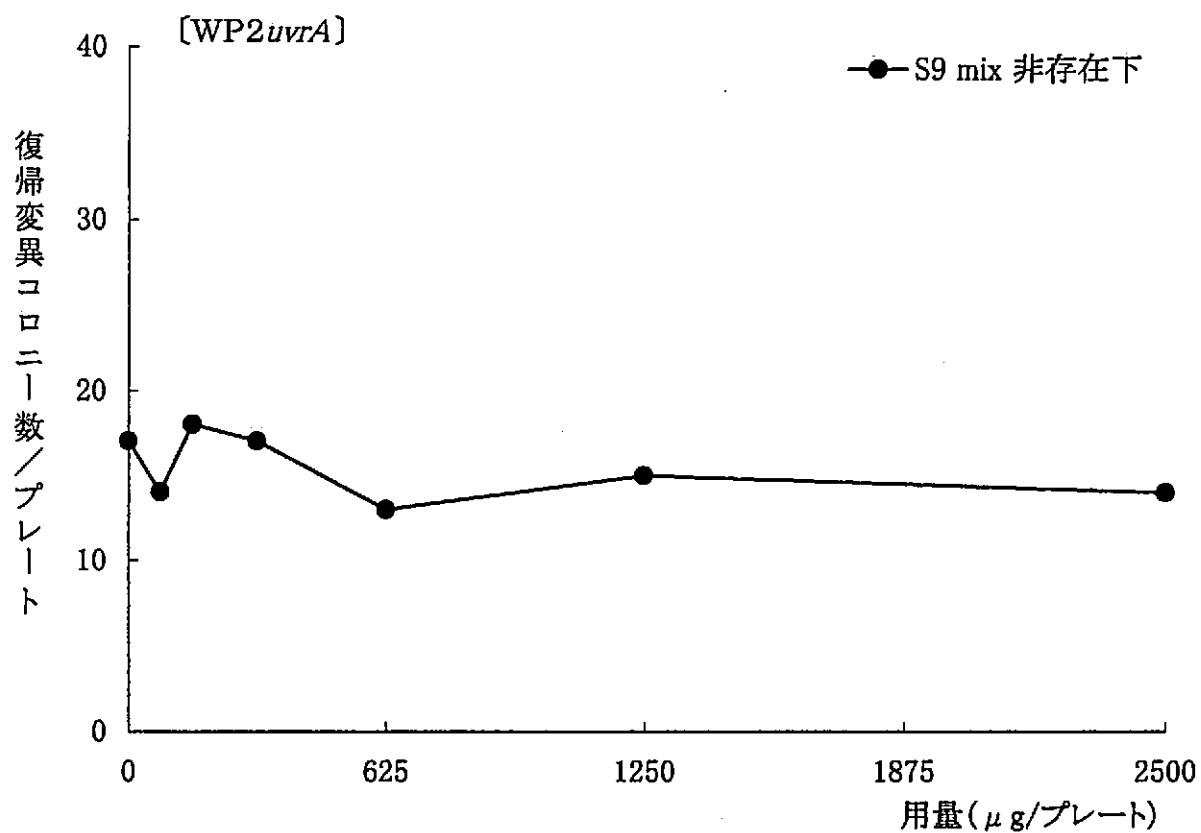


図 1-2 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

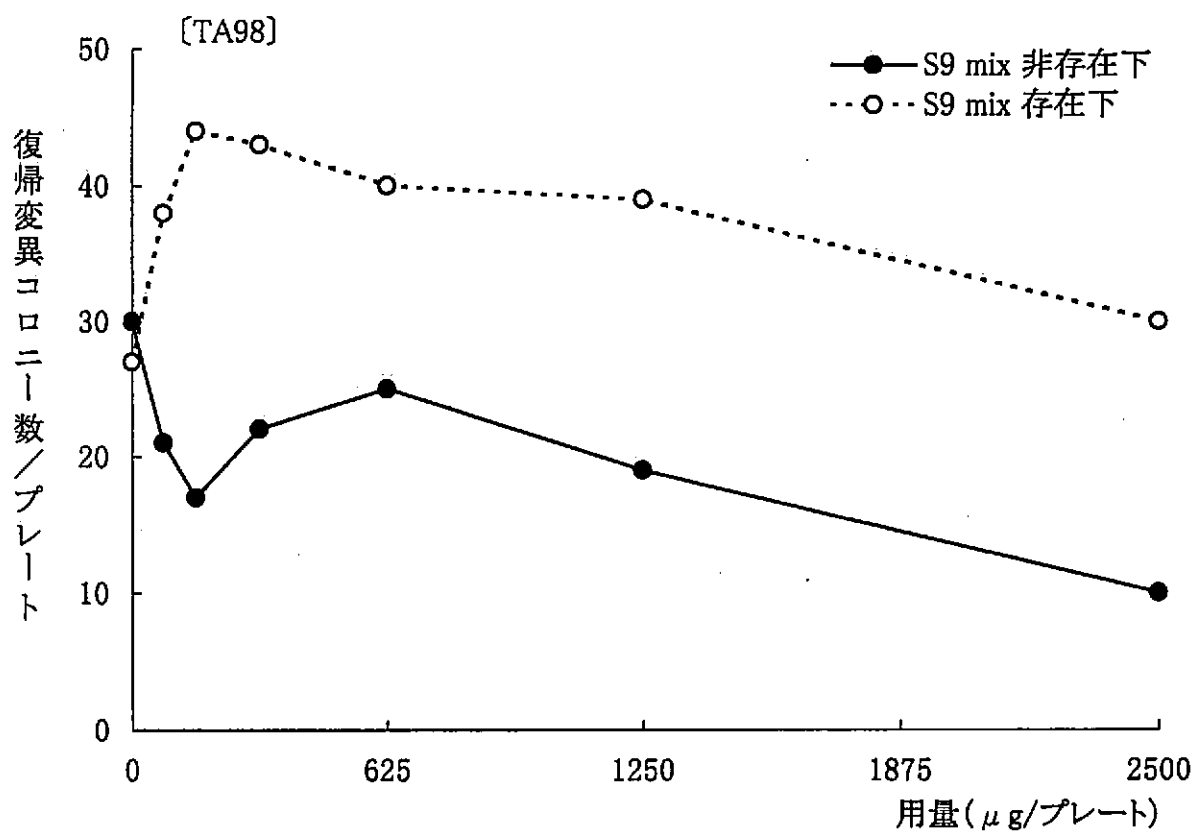


図 1-3 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

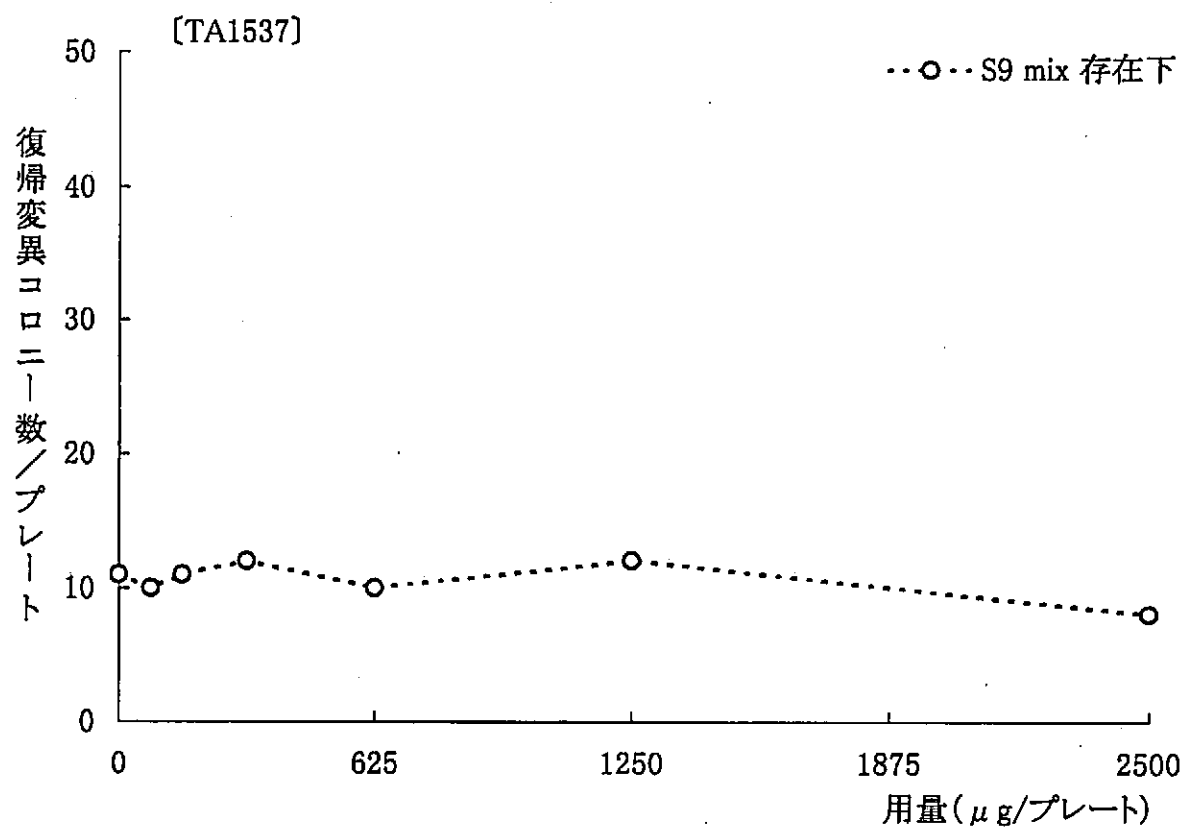
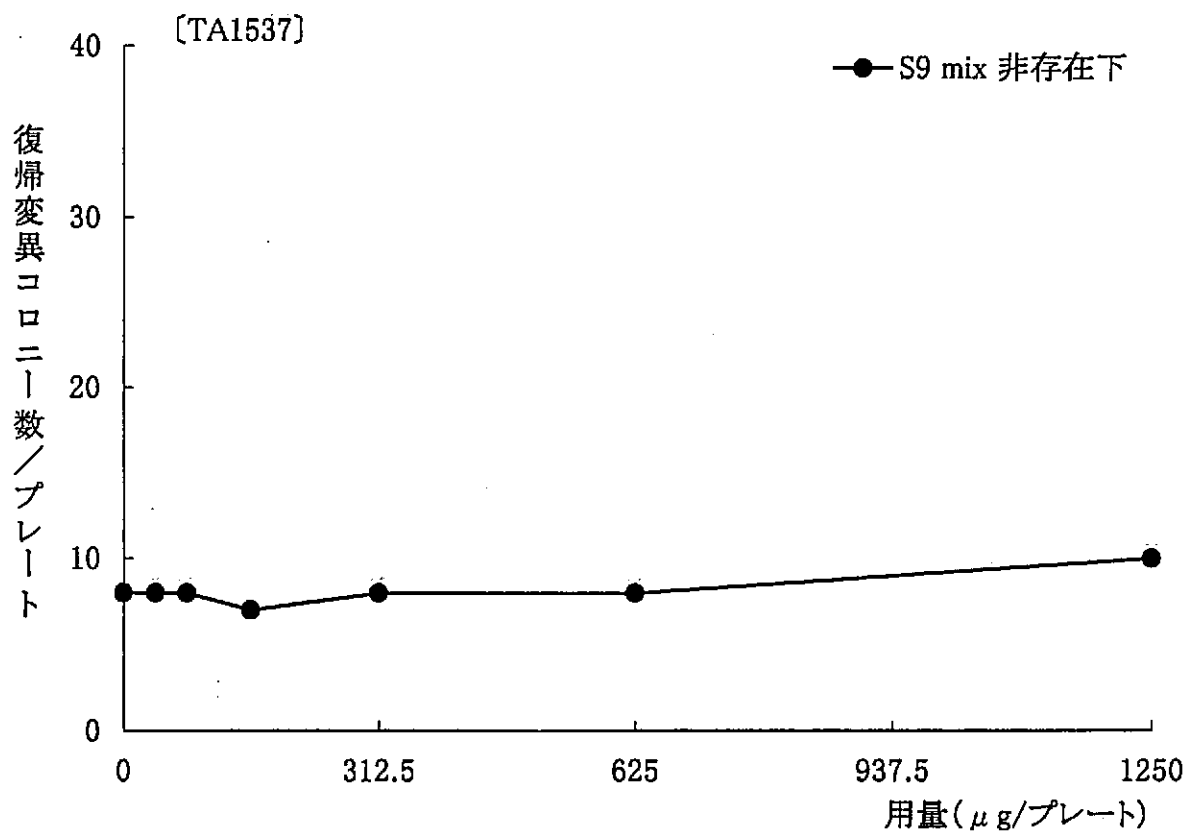


図 1-4 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目



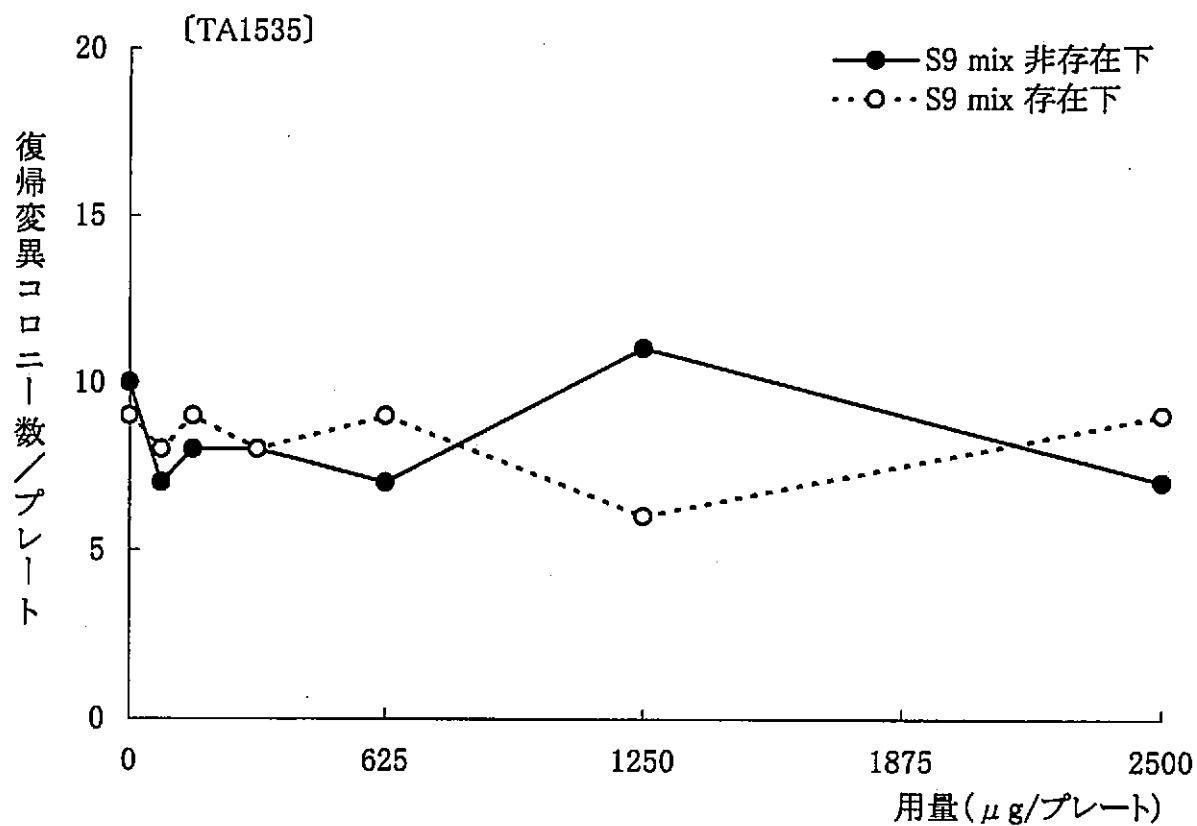
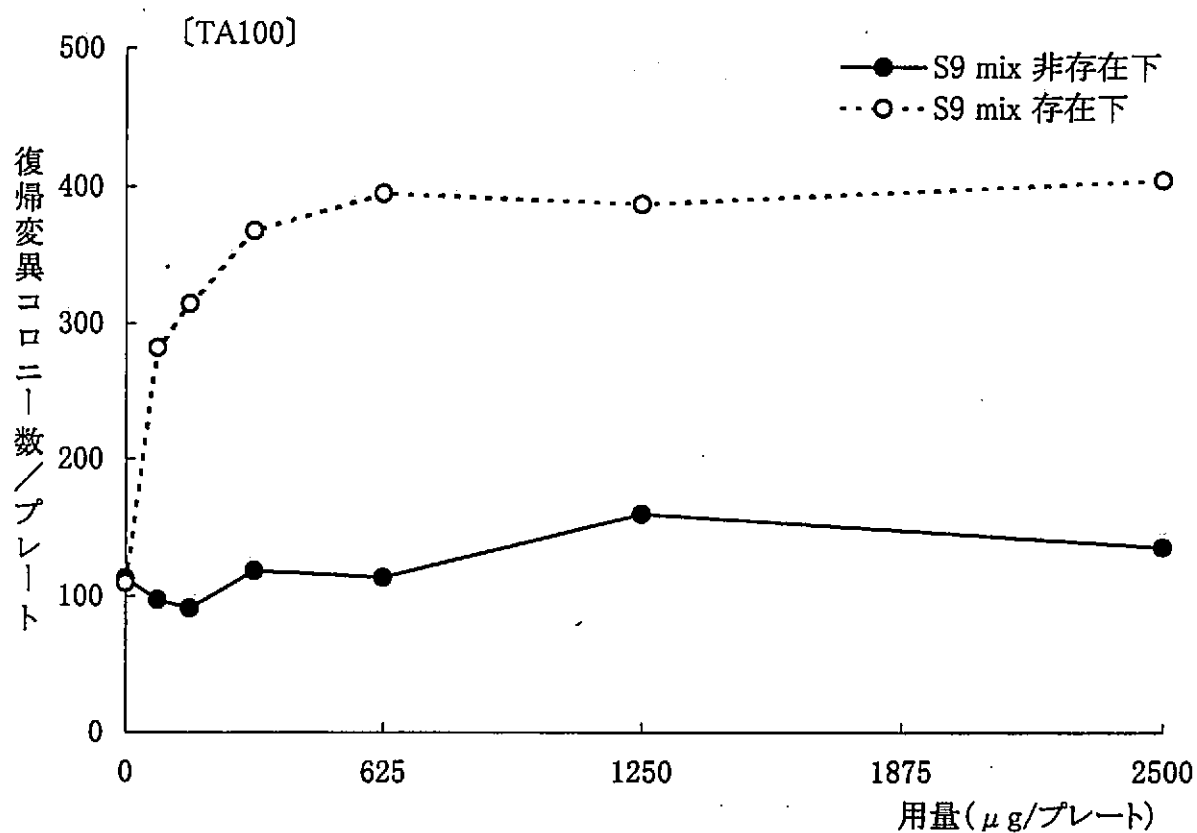


図 2-1 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果一本試験2回目

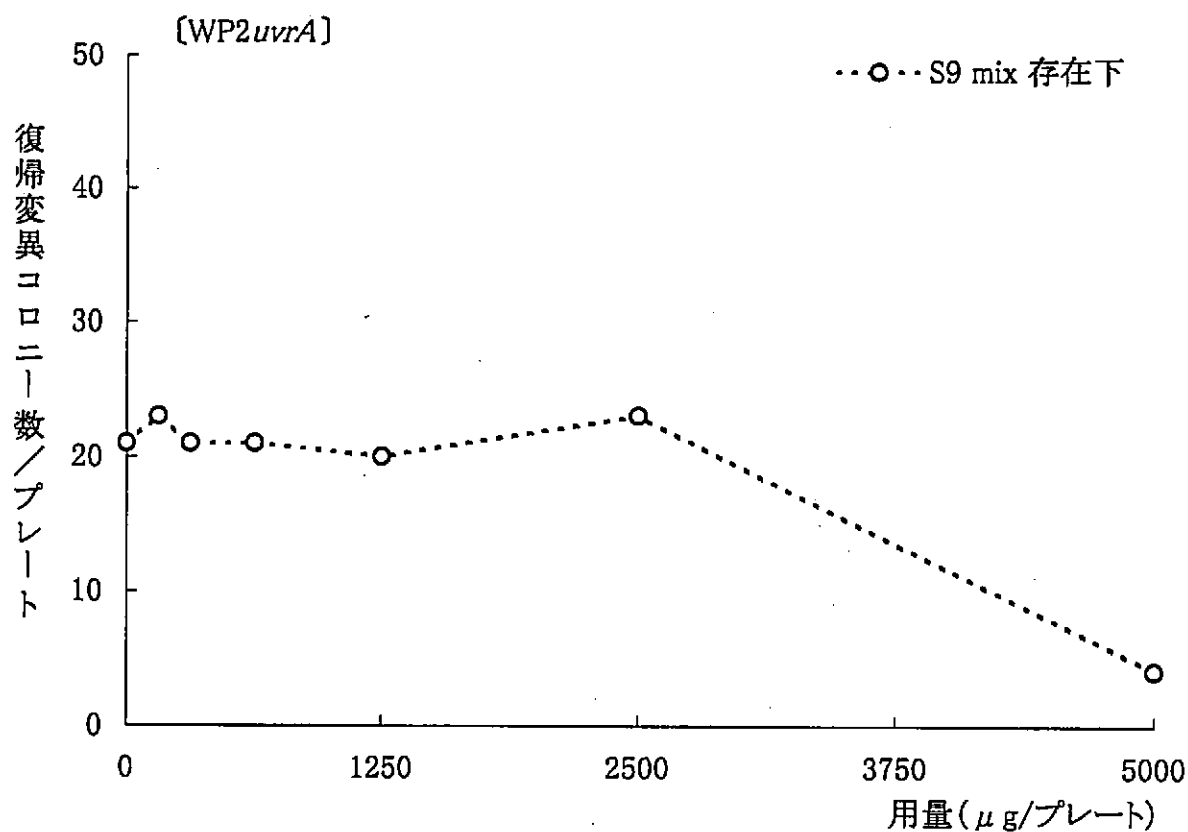
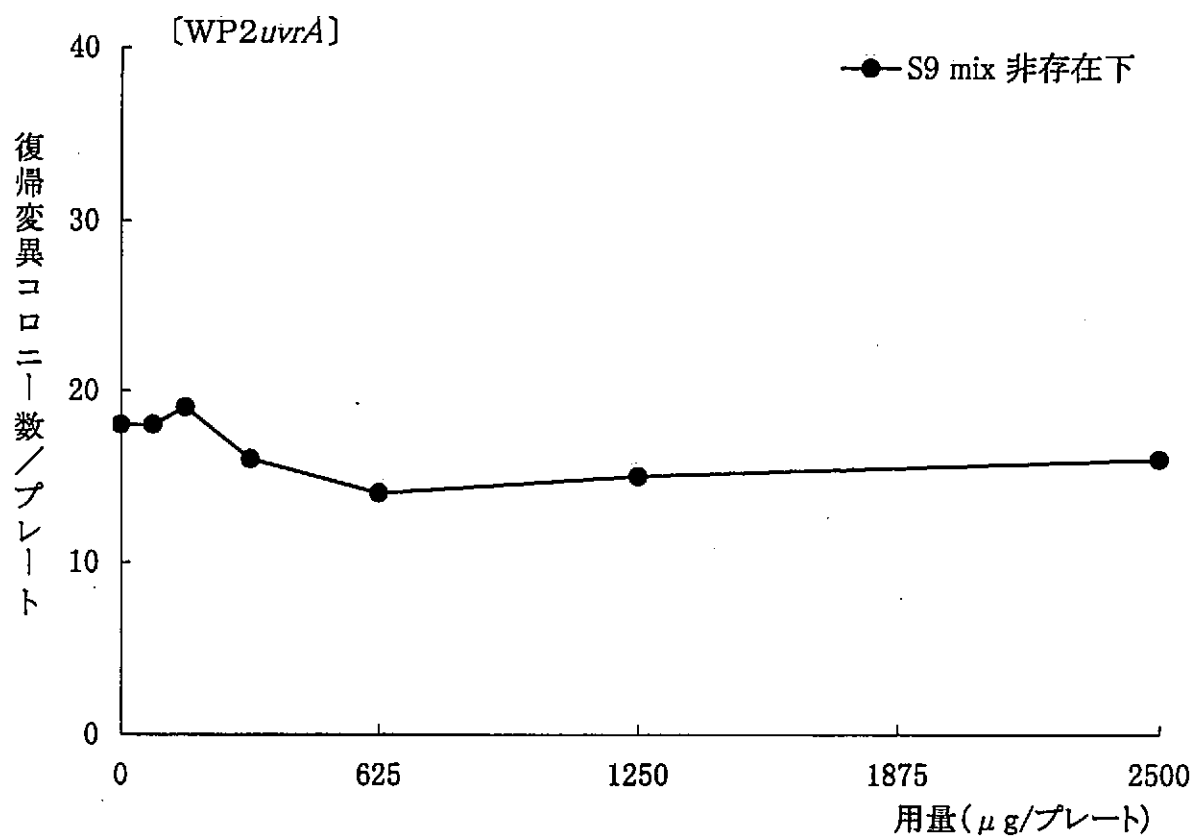


図 2-2 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

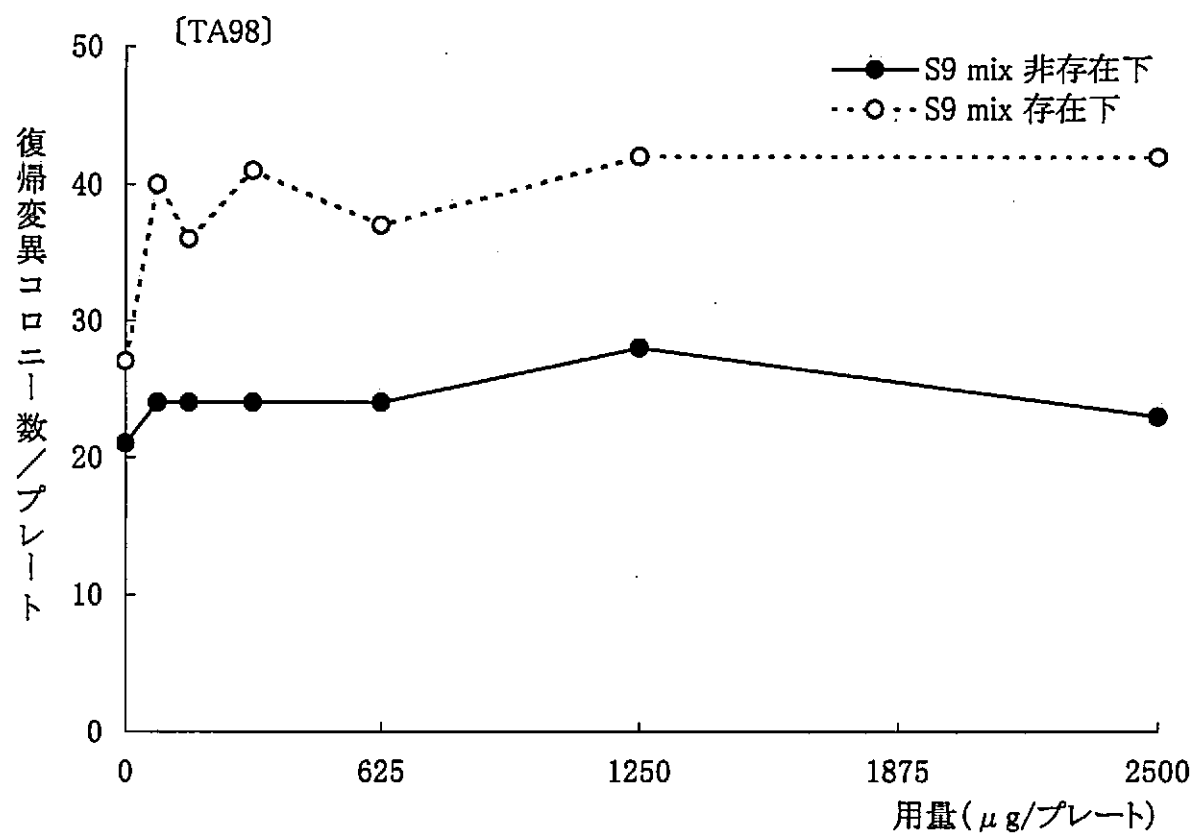


図 2-3 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果-本試験2回目

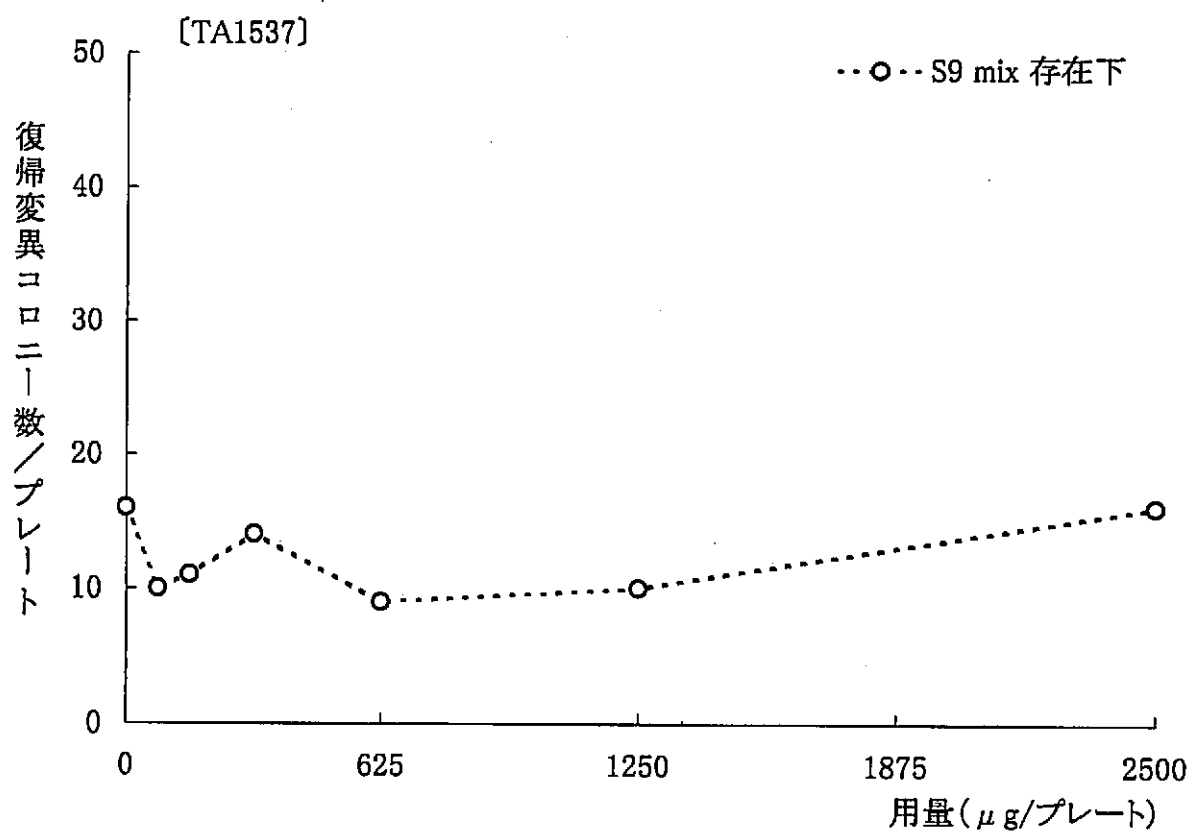
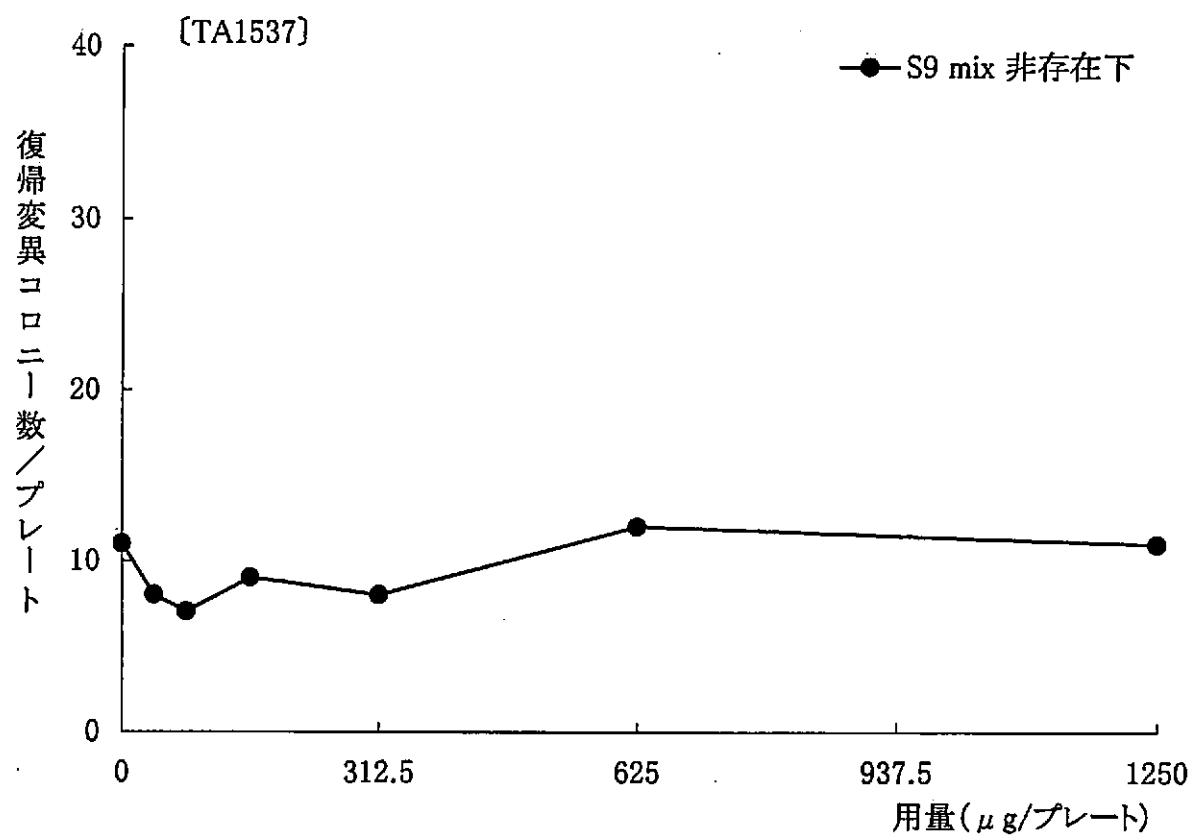


図 2-4 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果一本試験2回目

添付資料

復帰変異コロニー数：背景データ

自然復帰変異値（復帰変異コロニー数／プレート）						
指標菌株		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
直接法	n	274	247	269	278	256
	平均	123	11	16	24	8
	標準偏差	17	4	4	7	3
	最大値	182	31	29	41	18
	最小値	93	4	6	10	1
代謝活性化法	n	284	252	264	260	252
	平均	118	10	20	34	13
	標準偏差	17	3	5	7	3
	最大値	164	20	35	56	28
	最小値	88	4	9	18	5
陽性対照値（復帰変異コロニー数／プレート）						
指標菌株		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
陽性対照物質		AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
用量（ $\mu$ g／プレート）		0.01	0.5	0.04	0.1	80
直接法	n	214	212	217	216	212
	平均	777	363	799	391	584
	標準偏差	180	78	177	71	219
	最大値	1139	842	1429	717	1510
	最小値	402	223	306	251	210
陽性対照物質		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
用量（ $\mu$ g／プレート）		1	2	10	1	2
代謝活性化法	n	226	212	218	207	211
	平均	507	161	874	316	103
	標準偏差	124	49	211	89	39
	最大値	876	371	1540	759	245
	最小値	280	85	410	173	51

AF-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

2-AA：2-アミノアントラセン

細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的事項

既存化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2, 4-ジメチルアニリン		
別 名	2, 4-キシリジン		
構造式または示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)	$C_8H_{11}N$		
試験に供した既存 化学物質の純度	99.1%	試験に供した既存 化学物質の Lot.No.	
不純物の名称及び濃度	—		
CAS 番号	95-68-1		
分 子 量	121.18	蒸 気 圧	133Pa/52.6°C
融 点	14°C	分配係数	—
沸 点	214°C		
常温における性状	微黄色透明液体		
安 定 性	常温で安定		
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	—
	DMSO	可溶	安定
	エタノール	可溶	—
	その他( )	—	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

## 2. 試験に用いた菌株

菌株名	入 手 先	入 手 先
TA98	国 立 公 衆 衛 生 院	平成6年12月19日
TA100	国 立 公 衆 衛 生 院	平成6年12月19日
TA1535	国 立 公 衆 衛 生 院	平成6年12月19日
TA1537	国 立 公 衆 衛 生 院	平成6年12月19日
WP2uvrA	国 立 公 衆 衛 生 院	平成6年12月19日

## 3. S9 mix

### (1) S9 mix の入手方法

自 製 ・ 購 入 の 別	1. 自 製 ② 購入 (製造元 キッコーマン株式会社)
製 造 年 月 日	平成13年8月10日 (FSM-449) , 11月22日 (FSM-455) 製造
購入の場合の Lot No.	FSM-449, FSM-455
保 存 温 度	-80℃以下 (超低温槽 ウルトラディープ CF-41SD)

### (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 および 5, 6-BF
性	雄	投 与 方 法	腹 腔 内 投 与
週 齢	7 週	投与期間及び投与量 (mg/kg 体重)	PB 30 mg/kg 1 回
体 重	203~246 (FSM-449) g 204~232 (FSM-455) g		PB 60 mg/kg 3 回 5, 6-BF 80 mg/kg 1 回

### (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 $\mu$ mol
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu$ mol	NADH	4 $\mu$ mol
KCl	33 $\mu$ mol	Na-リッ酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ 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 (%)
	DMSO	和光純薬工業(株)	DWH7397	—	100
溶媒選択の理由	被験物質は水に難溶であり，予備的検討の結果，DMSOに可溶であったため，溶媒にはDMSOを用いた。				
被験物質溶媒の性状	(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	—				
溶媒の調製から使用までの保存時間と温度	1時間以内， 20℃				
純度換算の有無	有 (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.
	Bacto nutrient broth dehydrated	Difco Laboratories	44077JK
前培養時間	12時間		
培養容器 (形状・容量)	モルтон栓付三角コルベン， 300 mL		
培養液量	15 mL	接種菌量	25μL

##### (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	TA98	TA1537
生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	1.50	1.72	1.30	1.41	1.21
	本試験(1回目)	1.50	1.62	1.38	1.33	1.14
	本試験(2回目)	1.50	1.62	1.30	1.41	1.21
測定方法		(1) 0.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	平成13年7月17日 製造 (ANI460GQ) 平成13年9月28日 製造 (ANI630IQ)
購入の場合のLot No.	ANI460GQ, ANI630IQ
使用寒天の名称・製造元・Lot No.	伊那寒天 BA-30A, 伊那食品工業株式会社, 00221

## 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

組 成	懸濁菌液	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
	S9 mix(代謝活性化法による場合)	0.5 mL
	トッブアガー	2.0 mL
	その他 ( )	—
プレインキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	48 時間

## 8. コロニーの計測法

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 )

## 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
判定の理由	<p>試験を2回行った結果、代謝活性化法における TA100で陰性（溶媒）対照値の2倍を超える復帰変異コロニー数の増加が認められた。</p> <p>陽性対照群では、それぞれの菌株に対して陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められ、試験が適切に行われたことを示した。</p> <p>以上の結果より、本実験条件下において本被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定した。</p>	

### (3) 参考事項

用量設定試験（予備試験）は、39.1～5000 $\mu$ g/プレートの範囲で行った。その結果、直接法の場合は、TA1537 の 1250 $\mu$ g/プレート以上、TA100, TA1535, TA98 および WP2uvrA の 2500 $\mu$ g/プレート以上の用量で、また、代謝活性化法の場合は、TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 2500 $\mu$ g/プレート以上、WP2uvrA の 5000 $\mu$ g/プレートの用量で菌の生育阻害が認められた。

したがって、本試験は、直接法の場合は、TA1537 では 39.1～1250 $\mu$ g/プレート、TA98, TA100, TA1535 および WP2uvrA では 78.1～2500 $\mu$ g/プレートの範囲（公比2）で、また、代謝活性化法の場合は、TA98, TA100, TA1535 および TA1537 では 78.1～2500 $\mu$ g/プレート、WP2uvrA では 156～5000 $\mu$ g/プレートの範囲（公比2）で設定した。

菌の生育阻害については、直接法および代謝活性化法のいずれの菌株とも最高用量において認められた。

## 10. その他

試験実施施設	名 称	財団法人 畜産生物科学安全研究所	
	所 在 地	神奈川県相模原市橋本台三丁目7番11号	電話 042 (762) 2775 FAX 042 (762) 7979
試験責任者	職 氏 名	主任研究員	
	経験年数	15 年	
試験期間	平成13年12月21日 より 平成14年3月20日		
試験番号	01-169		

表 1-1 S9 mix 非存在下における 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果  
〔本試験1回目－直接法〕

用 量 〔 $\mu$ g/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	93	7	18	24	12
〔ジメチル スルホキシド〕	98	7	10	31	3
	103	6	23	34	10
	( 98 $\pm$ 5 )	( 7 $\pm$ 1 )	( 17 $\pm$ 7 )	( 30 $\pm$ 5 )	( 8 $\pm$ 5 )
39 .1	---	---	---	---	6
	---	---	---	---	10
	---	---	---	---	9
	---	---	---	---	( 8 $\pm$ 2 )
78 .1	93	7	14	20	10
	99	9	14	23	6
	92	7	13	20	9
	( 95 $\pm$ 4 )	( 8 $\pm$ 1 )	( 14 $\pm$ 1 )	( 21 $\pm$ 2 )	( 8 $\pm$ 2 )
156	118	5	13	20	11
	114	6	21	13	5
	92	8	21	18	6
	( 108 $\pm$ 14 )	( 6 $\pm$ 2 )	( 18 $\pm$ 5 )	( 17 $\pm$ 4 )	( 7 $\pm$ 3 )
313	117	6	12	25	6
	115	6	24	22	10
	119	5	14	20	8
	( 117 $\pm$ 2 )	( 6 $\pm$ 1 )	( 17 $\pm$ 6 )	( 22 $\pm$ 3 )	( 8 $\pm$ 2 )
625	121	7	18	21	14
	115	6	11	25	8
	126	10	11	29	3
	( 121 $\pm$ 6 )	( 8 $\pm$ 2 )	( 13 $\pm$ 4 )	( 25 $\pm$ 4 )	( 8 $\pm$ 6 )
1250	155	5	19	21	14 *
	142	12	8	14	9 *
	142	7	18	23	6 *
	( 146 $\pm$ 8 )	( 8 $\pm$ 4 )	( 15 $\pm$ 6 )	( 19 $\pm$ 5 )	( 10 $\pm$ 4 )
2500	117 *	4 *	12 *	7 *	---
	114 *	2 *	15 *	12 *	---
	110 *	6 *	15 *	12 *	---
	( 114 $\pm$ 4 )	( 4 $\pm$ 2 )	( 14 $\pm$ 2 )	( 10 $\pm$ 3 )	---
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	779	373	908	473	268
コロニー数	660	371	863	457	270
/プレート	738	349	899	472	317
	( 726 $\pm$ 60 )	( 364 $\pm$ 13 )	( 890 $\pm$ 24 )	( 467 $\pm$ 9 )	( 285 $\pm$ 28 )

( ) : 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた

--- : 検査せず

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 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果  
〔本試験1回目一代謝活性化法〕

用 量 〔 $\mu$ g/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	99	8	15	21	9
〔ジメチル スルホキシド〕	121	10	25	32	12
	120	8	17	27	13
	(113 $\pm$ 12)	(9 $\pm$ 1)	(19 $\pm$ 5)	(27 $\pm$ 6)	(11 $\pm$ 2)
78 .1	250	9	---	37	11
	266	7	---	42	8
	252	5	---	36	11
	(256 $\pm$ 9)	(7 $\pm$ 2)	---	(38 $\pm$ 3)	(10 $\pm$ 2)
156	294	9	25	37	8
	305	9	24	44	13
	281	12	27	50	12
	(293 $\pm$ 12)	(10 $\pm$ 2)	(25 $\pm$ 2)	(44 $\pm$ 7)	(11 $\pm$ 3)
313	305	16	25	46	9
	325	6	20	45	16
	348	9	16	38	10
	(326 $\pm$ 22)	(10 $\pm$ 5)	(20 $\pm$ 5)	(43 $\pm$ 4)	(12 $\pm$ 4)
625	382	8	27	44	9
	352	10	27	40	14
	332	12	22	35	8
	(355 $\pm$ 25)	(10 $\pm$ 2)	(25 $\pm$ 3)	(40 $\pm$ 5)	(10 $\pm$ 3)
1250	370	10	22	36	15
	372	8	23	41	13
	402	8	23	40	9
	(381 $\pm$ 18)	(9 $\pm$ 1)	(23 $\pm$ 1)	(39 $\pm$ 3)	(12 $\pm$ 3)
2500	254 *	5 *	17	42 *	5 *
	231 *	5 *	24	14 *	9 *
	290 *	3 *	16	33 *	10 *
	(258 $\pm$ 30)	(4 $\pm$ 1)	(19 $\pm$ 4)	(30 $\pm$ 14)	(8 $\pm$ 3)
5000	---	---	12 *	---	---
	---	---	7 *	---	---
	---	---	0 *	---	---
	---	---	(6 $\pm$ 6)	---	---
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
$\mu$ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	428	134	431	267	97
コロニー数	350	153	506	251	82
/プレート	358	148	495	247	94
	(379 $\pm$ 43)	(145 $\pm$ 10)	(477 $\pm$ 41)	(255 $\pm$ 11)	(91 $\pm$ 8)

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた

--- : 検査せず

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 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果  
〔本試験2回目－直接法〕

用 量 〔 $\mu$ g/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	103	9	23	15	12
〔ジメチル スルホキシド〕	107	10	15	26	15
	129	10	17	22	7
	( 113 $\pm$ 14 )	( 10 $\pm$ 1 )	( 18 $\pm$ 4 )	( 21 $\pm$ 6 )	( 11 $\pm$ 4 )
39 .1	--	--	--	--	10
	--	--	--	--	7
	--	--	--	--	7
	--	--	--	--	( 8 $\pm$ 2 )
78 .1	100	8	16	16	10
	96	7	24	22	6
	96	6	15	33	5
	( 97 $\pm$ 2 )	( 7 $\pm$ 1 )	( 18 $\pm$ 5 )	( 24 $\pm$ 9 )	( 7 $\pm$ 3 )
156	97	11	15	24	12
	88	5	22	21	8
	88	9	19	27	7
	( 91 $\pm$ 5 )	( 8 $\pm$ 3 )	( 19 $\pm$ 4 )	( 24 $\pm$ 3 )	( 9 $\pm$ 3 )
313	100	8	13	25	10
	112	10	15	27	8
	144	6	20	20	7
	( 119 $\pm$ 23 )	( 8 $\pm$ 2 )	( 16 $\pm$ 4 )	( 24 $\pm$ 4 )	( 8 $\pm$ 2 )
625	119	10	11	33	11
	117	5	16	25	11
	105	6	16	15	15
	( 114 $\pm$ 8 )	( 7 $\pm$ 3 )	( 14 $\pm$ 3 )	( 24 $\pm$ 9 )	( 12 $\pm$ 2 )
1250	158	13	11	21	15 *
	146	10	13	28	9 *
	178	9	22	35	8 *
	( 161 $\pm$ 16 )	( 11 $\pm$ 2 )	( 15 $\pm$ 6 )	( 28 $\pm$ 7 )	( 11 $\pm$ 4 )
2500	141 *	12 *	17 *	23 *	--
	129 *	4 *	16 *	18 *	--
	139 *	5 *	16 *	27 *	--
	( 136 $\pm$ 6 )	( 7 $\pm$ 4 )	( 16 $\pm$ 1 )	( 23 $\pm$ 5 )	--
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	827	365	955	411	712
コロニー数	769	264	822	468	688
/プレート	823	346	835	407	724
	( 806 $\pm$ 32 )	( 325 $\pm$ 54 )	( 871 $\pm$ 73 )	( 429 $\pm$ 34 )	( 708 $\pm$ 18 )

( ) : 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた

-- : 検査せず

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 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果  
〔本試験2回目ー代謝活性化法〕

用 量 〔 $\mu$ g/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	108	10	20	29	16
〔ジメチル スルホキシド〕	105	5	18	30	16
	116	11	26	22	15
	(110 $\pm$ 6)	(9 $\pm$ 3)	(21 $\pm$ 4)	(27 $\pm$ 4)	(16 $\pm$ 1)
78 .1	312	10	---	39	8
	258	9	---	39	10
	276	4	---	43	11
	(282 $\pm$ 27)	(8 $\pm$ 3)	---	(40 $\pm$ 2)	(10 $\pm$ 2)
156	337	11	31	36	7
	311	8	19	33	15
	295	9	20	39	10
	(314 $\pm$ 21)	(9 $\pm$ 2)	(23 $\pm$ 7)	(36 $\pm$ 3)	(11 $\pm$ 4)
313	356	8	23	42	17
	355	7	25	42	11
	392	9	14	39	14
	(368 $\pm$ 21)	(8 $\pm$ 1)	(21 $\pm$ 6)	(41 $\pm$ 2)	(14 $\pm$ 3)
625	403	13	16	40	7
	408	3	23	31	9
	375	11	25	41	10
	(395 $\pm$ 18)	(9 $\pm$ 5)	(21 $\pm$ 5)	(37 $\pm$ 6)	(9 $\pm$ 2)
1250	416	7	16	43	5
	372	5	19	38	8
	375	5	25	44	16
	(388 $\pm$ 25)	(6 $\pm$ 1)	(20 $\pm$ 5)	(42 $\pm$ 3)	(10 $\pm$ 6)
2500	387 *	13 *	22	41 *	19 *
	447 *	5 *	23	33 *	13 *
	383 *	10 *	25	52 *	17 *
	(406 $\pm$ 36)	(9 $\pm$ 4)	(23 $\pm$ 2)	(42 $\pm$ 10)	(16 $\pm$ 3)
5000	---	---	7 *	---	---
	---	---	2 *	---	---
	---	---	2 *	---	---
	---	---	(4 $\pm$ 3)	---	---
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
$\mu$ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	408	127	516	301	101
コロニー数	452	146	587	284	110
/プレート	444	118	556	279	73
	(435 $\pm$ 23)	(130 $\pm$ 14)	(553 $\pm$ 36)	(288 $\pm$ 12)	(95 $\pm$ 19)

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた

--- : 検査せず

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3 2, 4-ジメチルアニリンの比活性

	菌株名	-S9 mix		+S9 mix	
		比活性	計算に用いた用量	比活性	計算に用いた用量
本試験 1回目	TA100	—	—	1831.0 /mg	78.1 $\mu$ g/プレート
				1153.8 /mg	156 $\mu$ g/プレート
				680.5 /mg	313 $\mu$ g/プレート
				387.2 /mg	625 $\mu$ g/プレート
				214.4 /mg	1250 $\mu$ g/プレート
				58.0 /mg	2500 $\mu$ g/プレート
本試験 2回目	TA100	—	—	2202.3 /mg	78.1 $\mu$ g/プレート
				1307.7 /mg	156 $\mu$ g/プレート
				824.3 /mg	313 $\mu$ g/プレート
				456.0 /mg	625 $\mu$ g/プレート
				222.4 /mg	1250 $\mu$ g/プレート
				118.4 /mg	2500 $\mu$ g/プレート

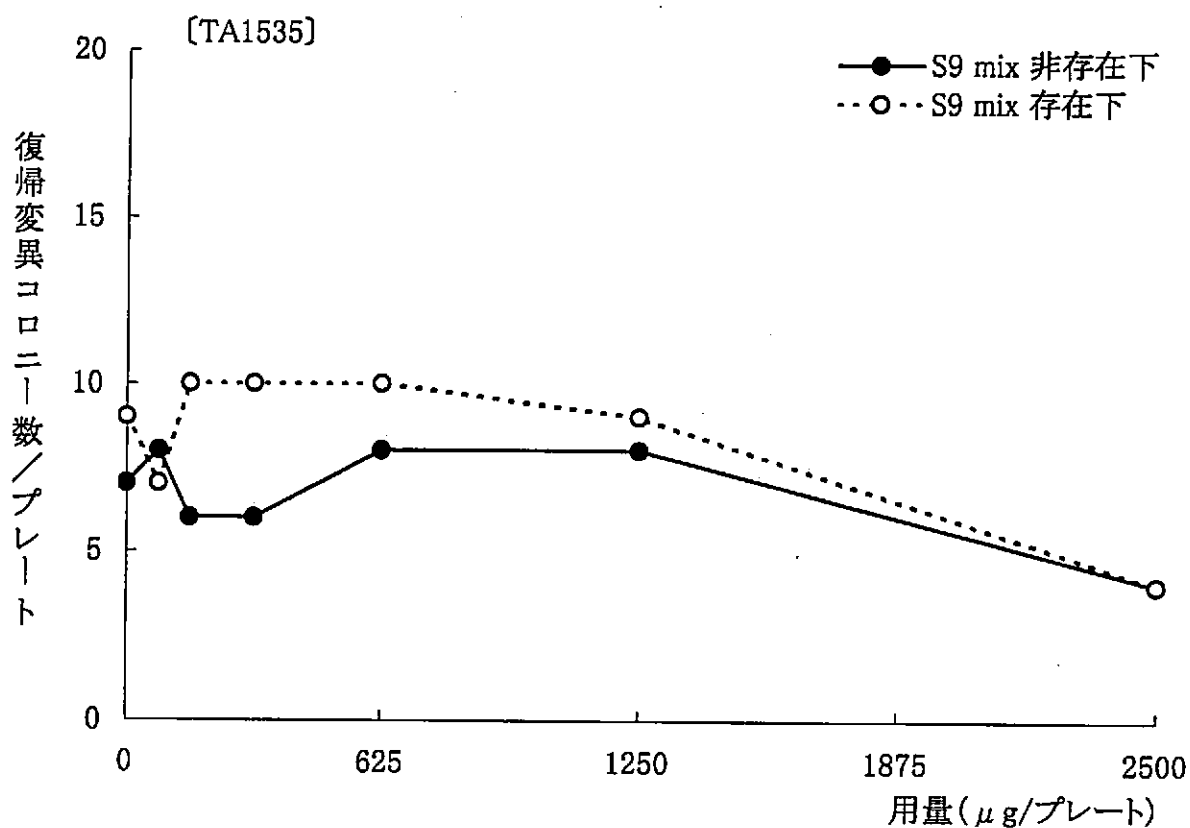
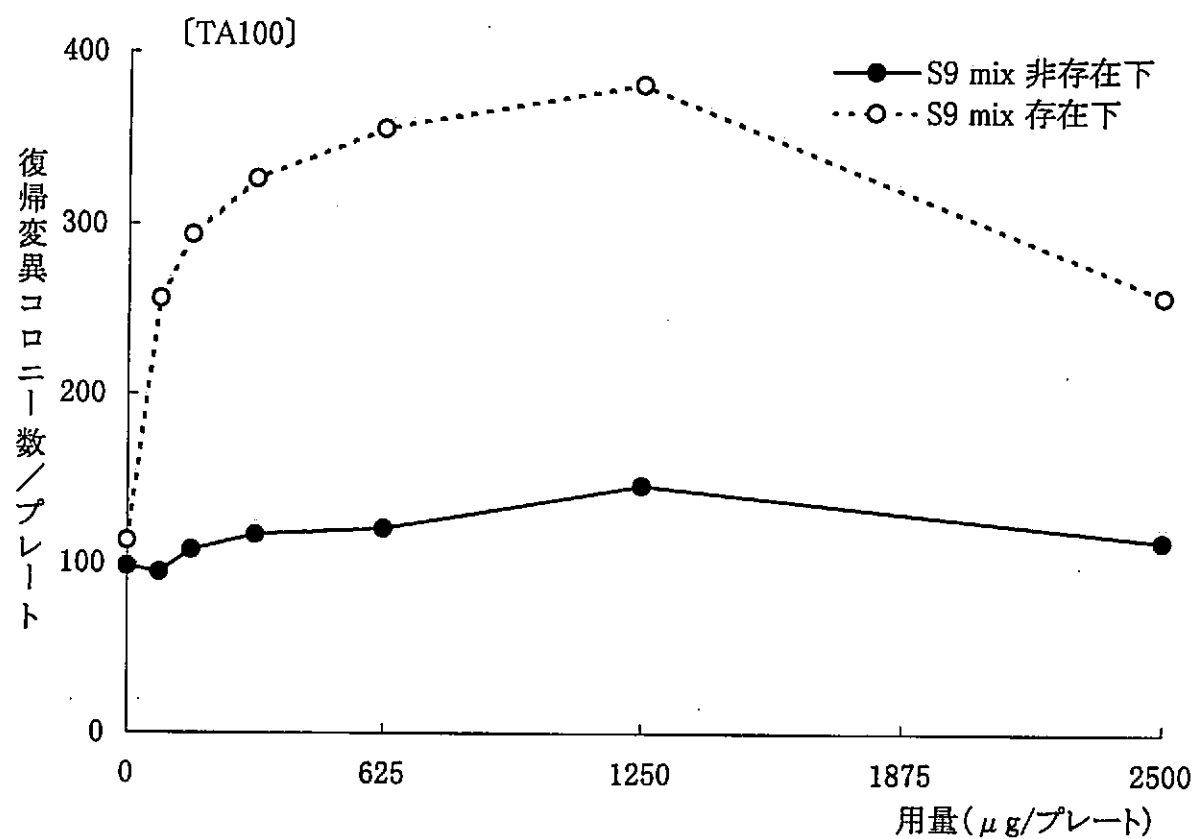


図 1-1 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目



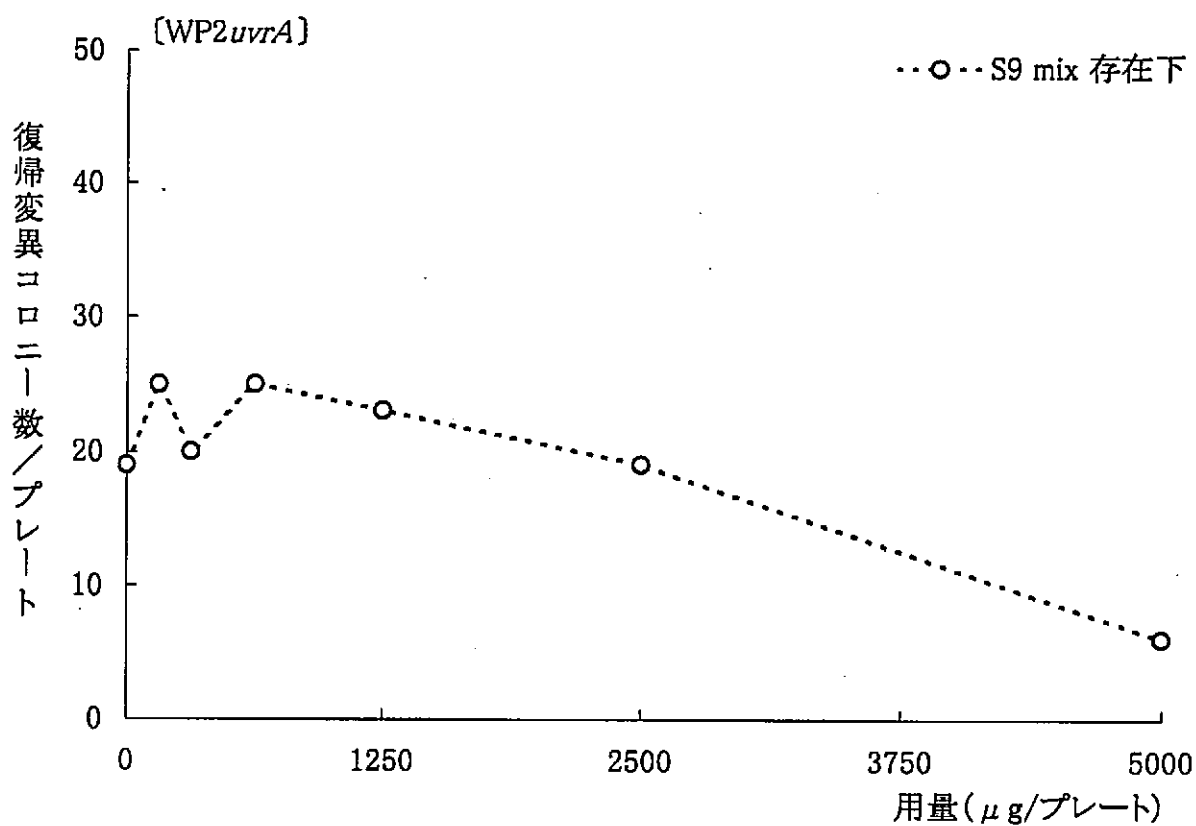
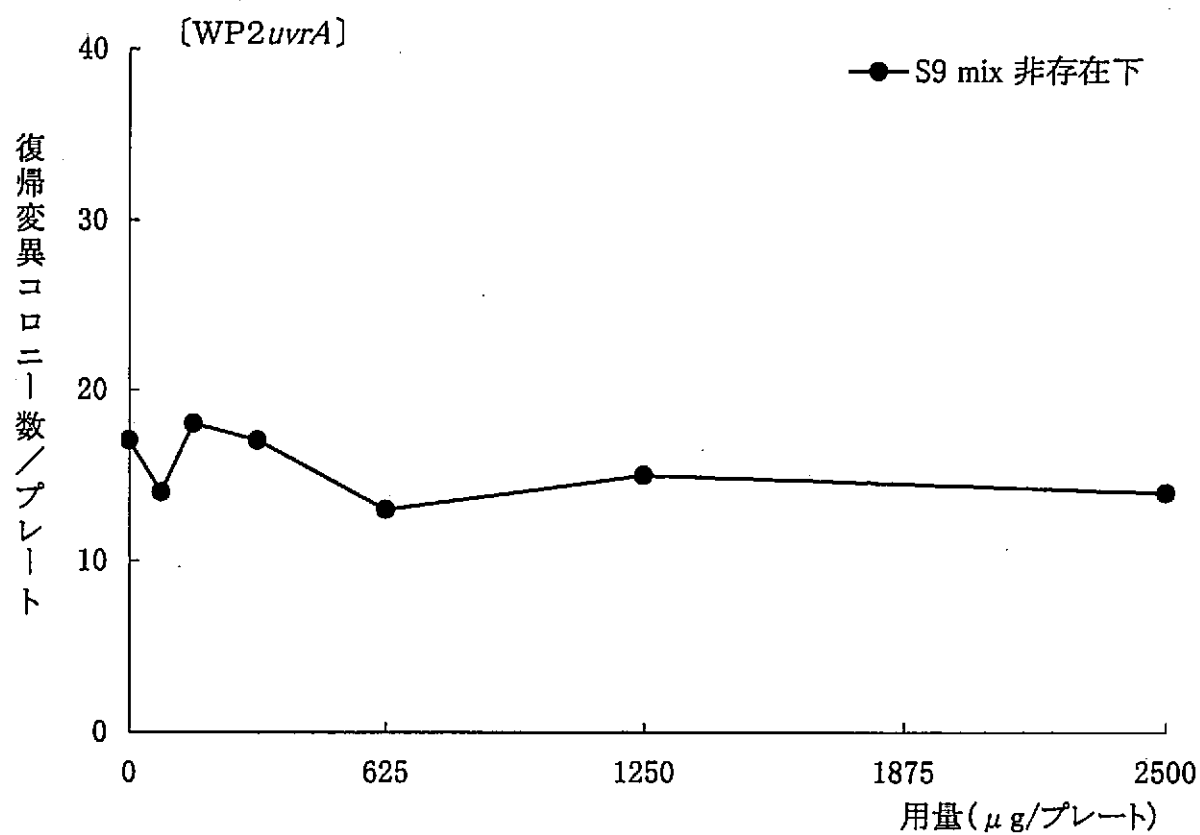


図 1-2 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

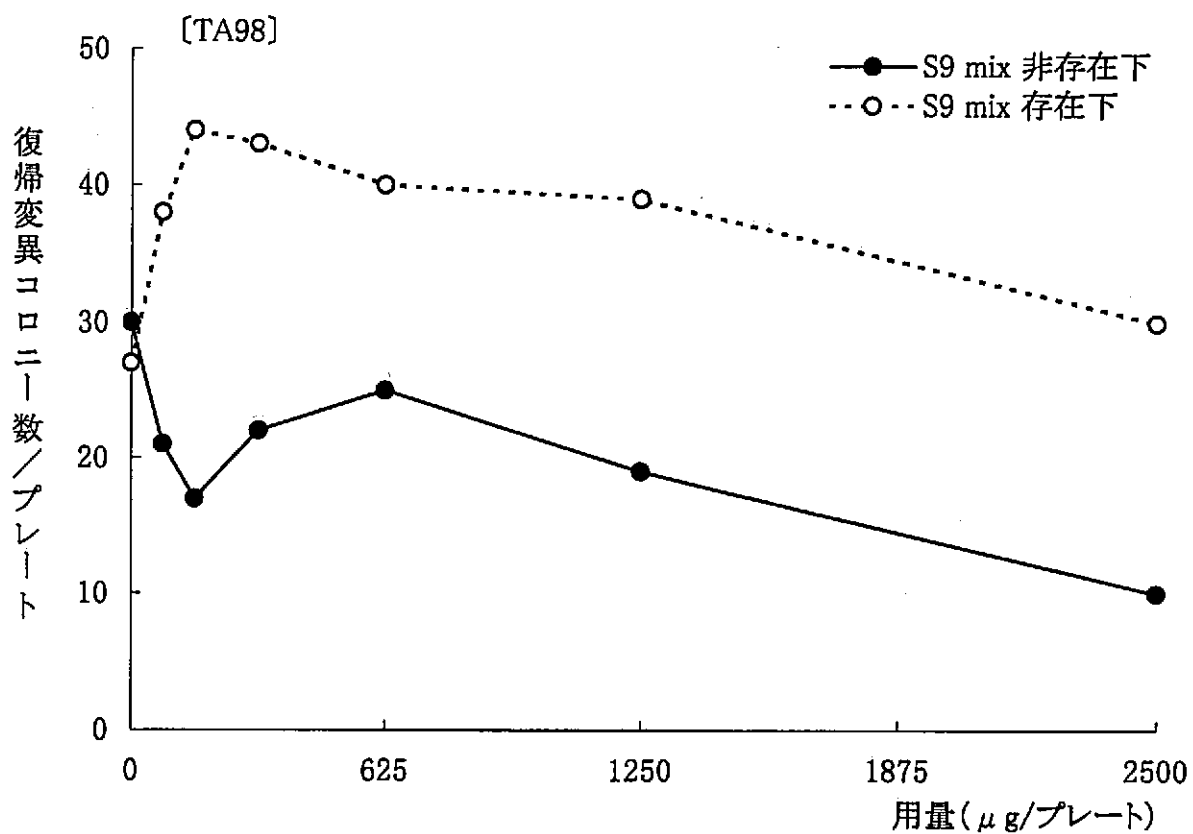


図 1-3 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

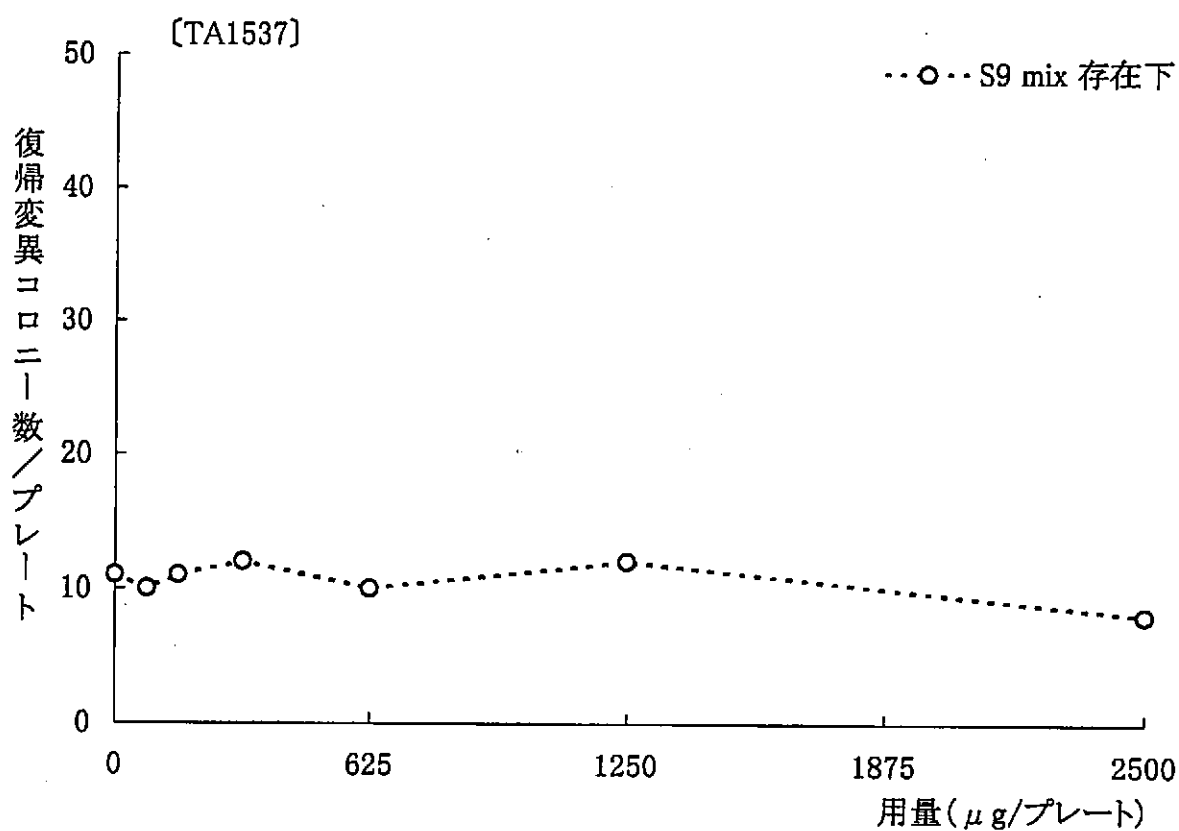
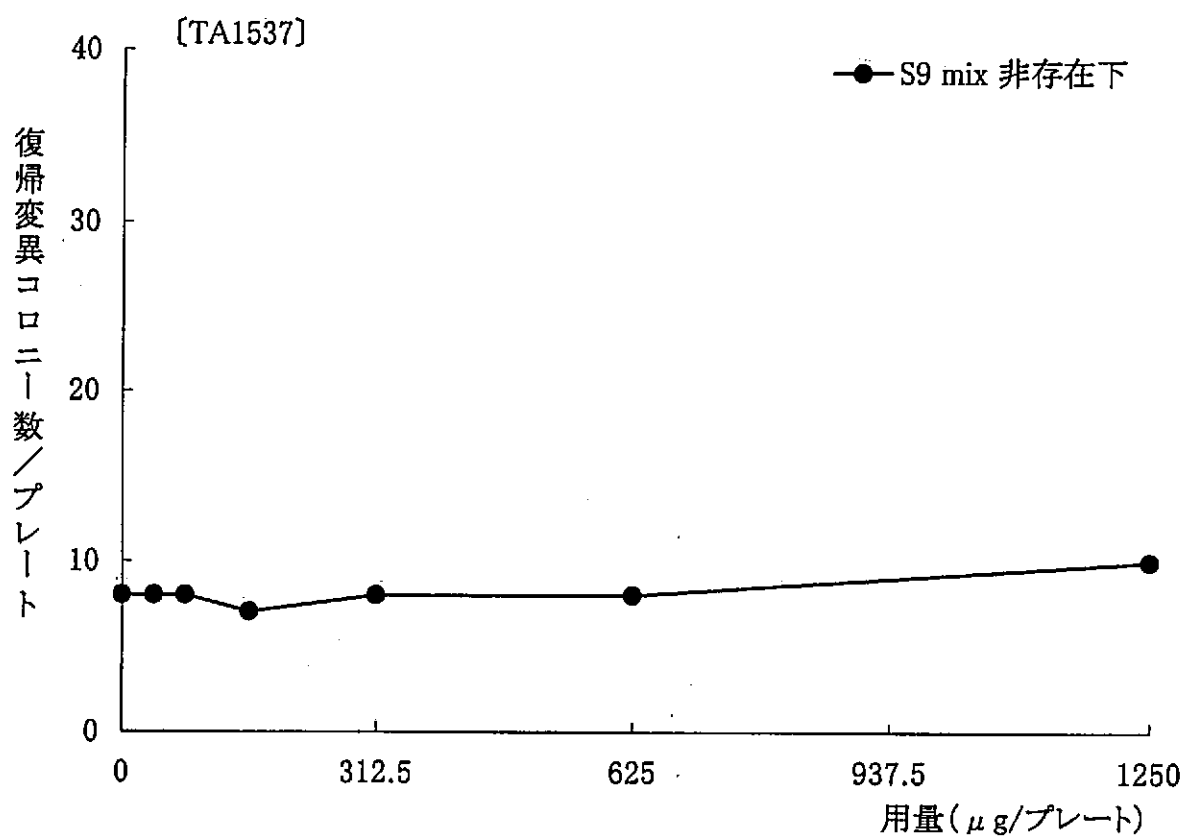


図 1-4 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

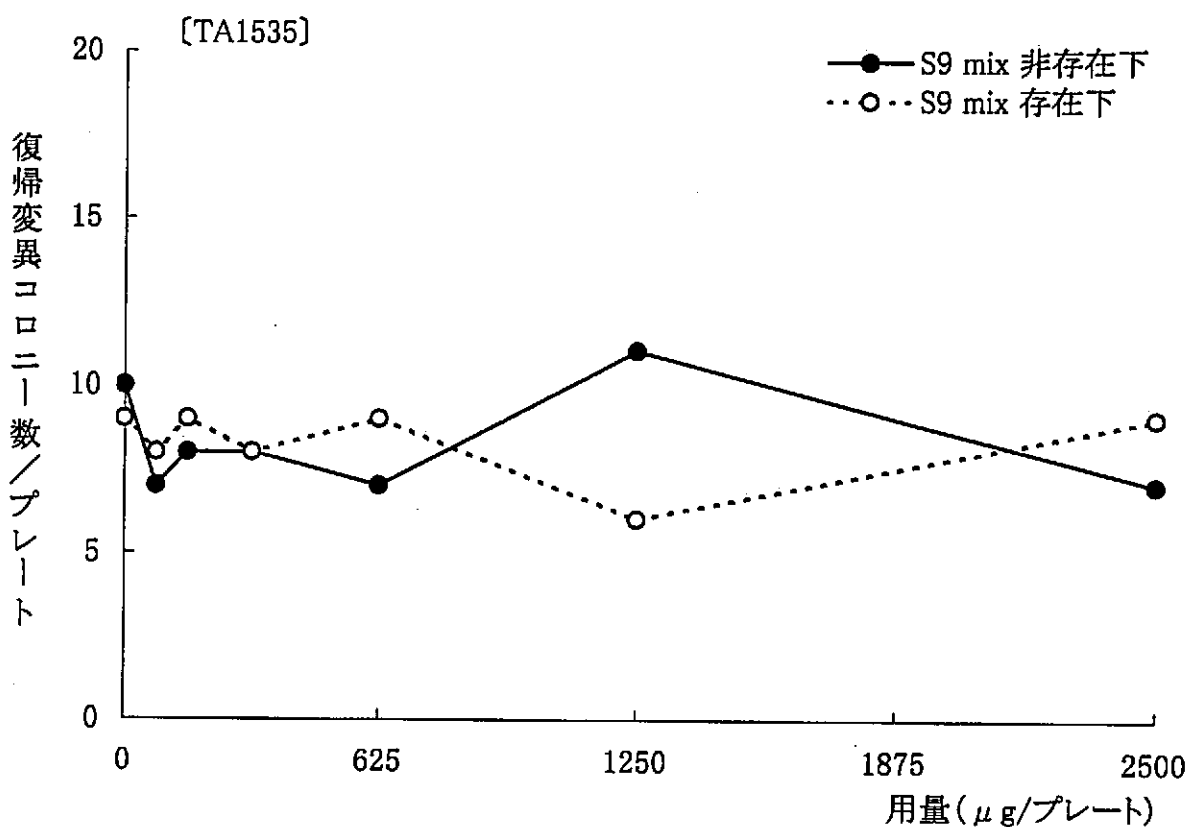
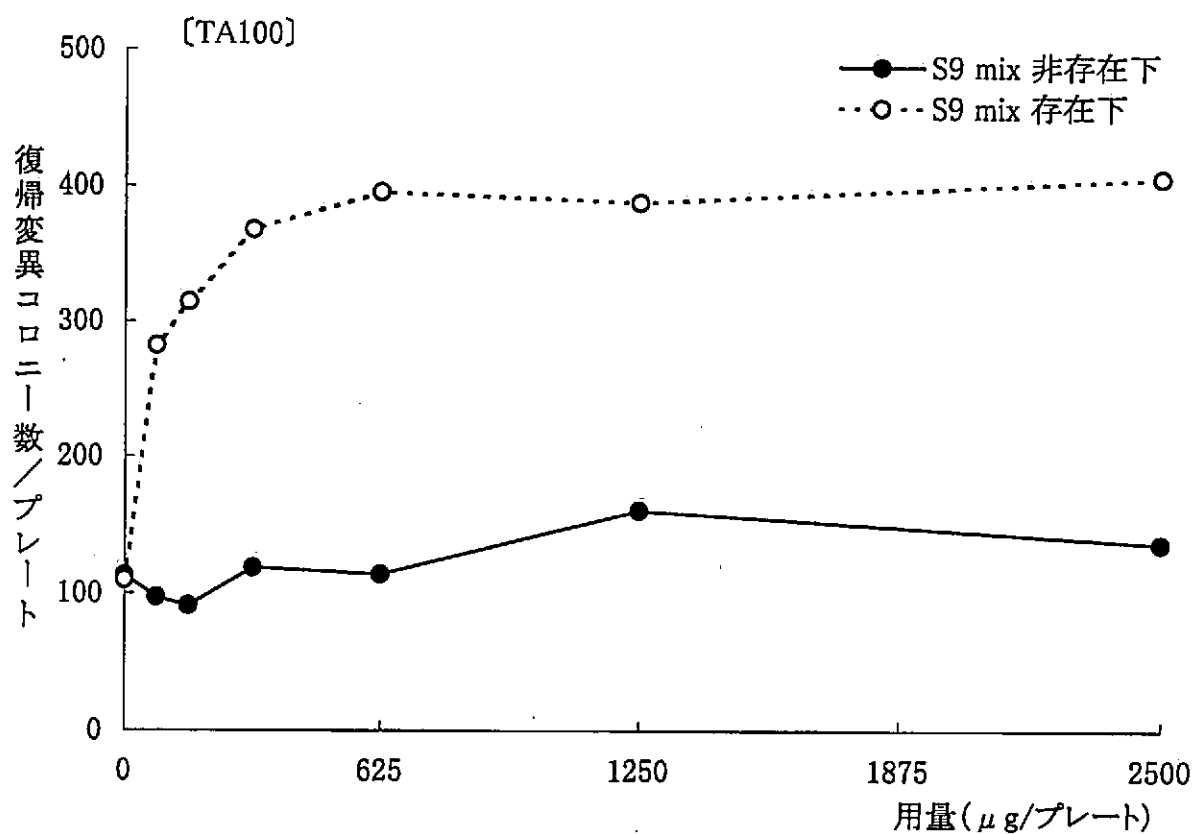


図 2-1 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

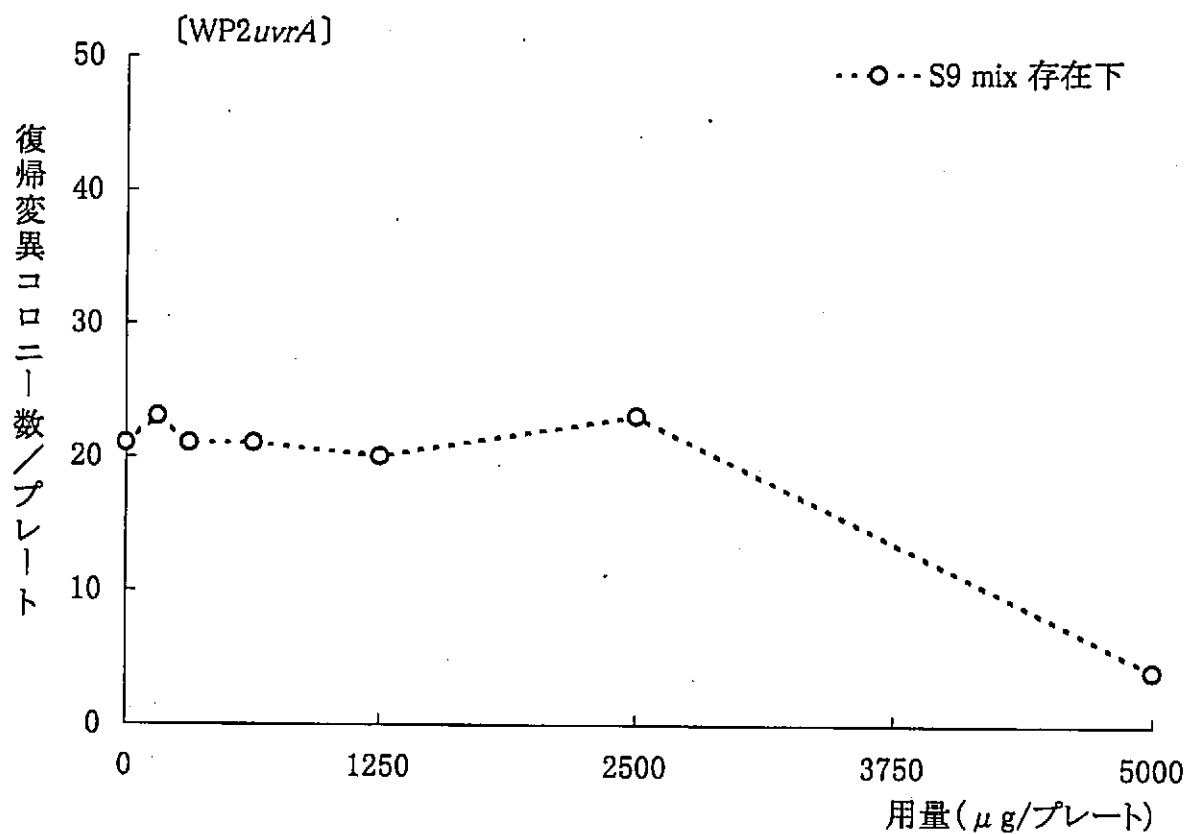
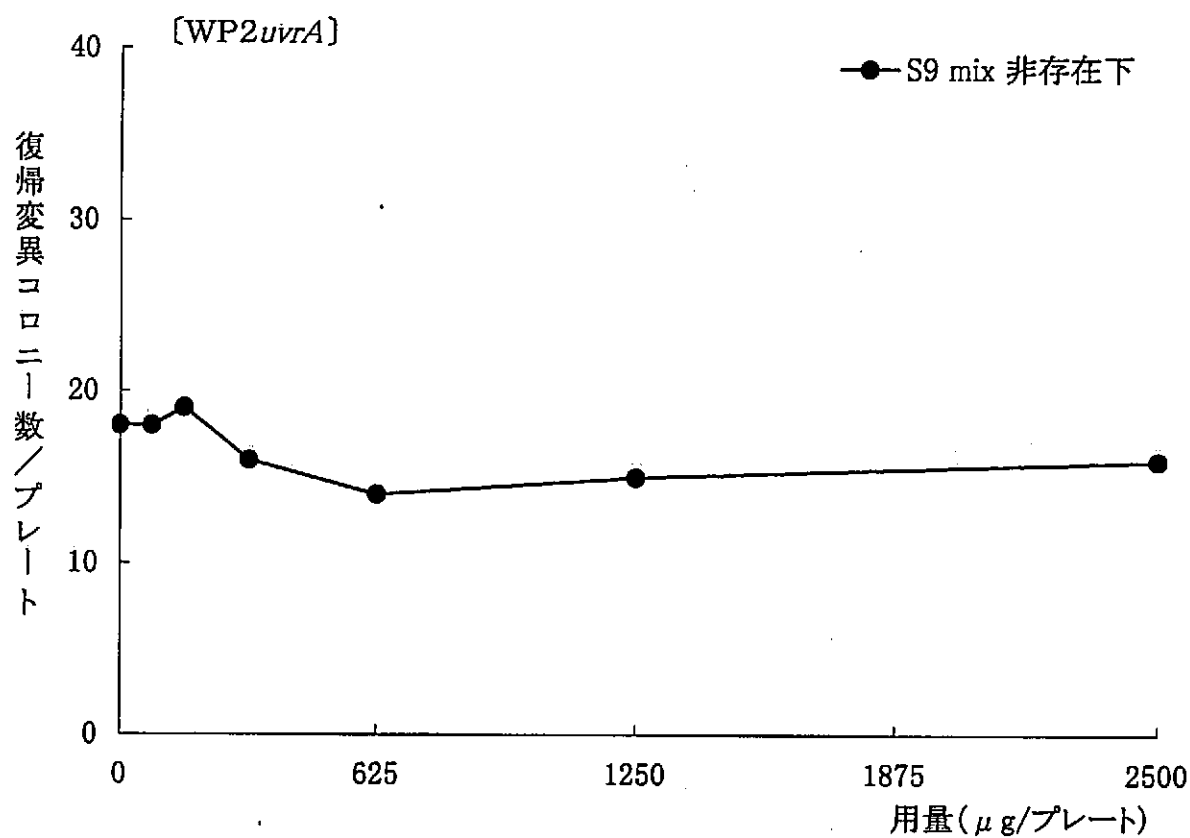


図 2-2 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

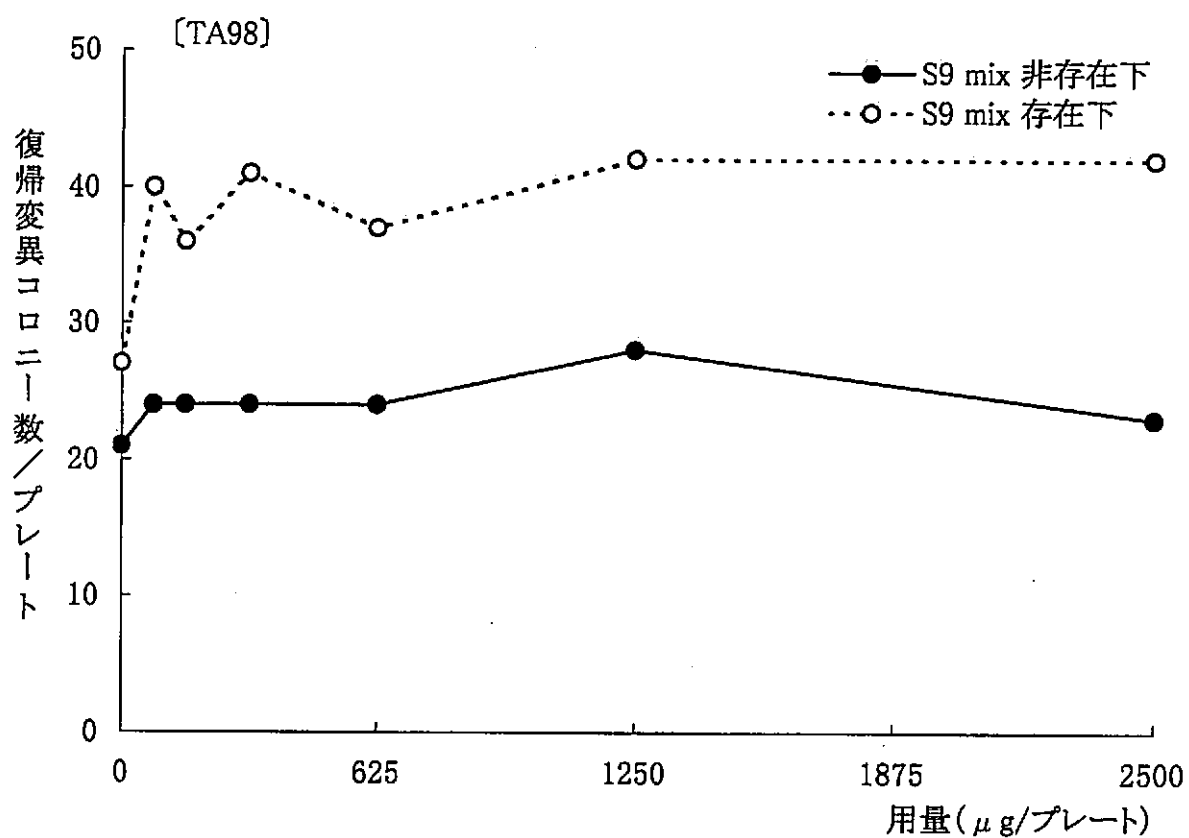


図 2-3 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果-本試験2回目

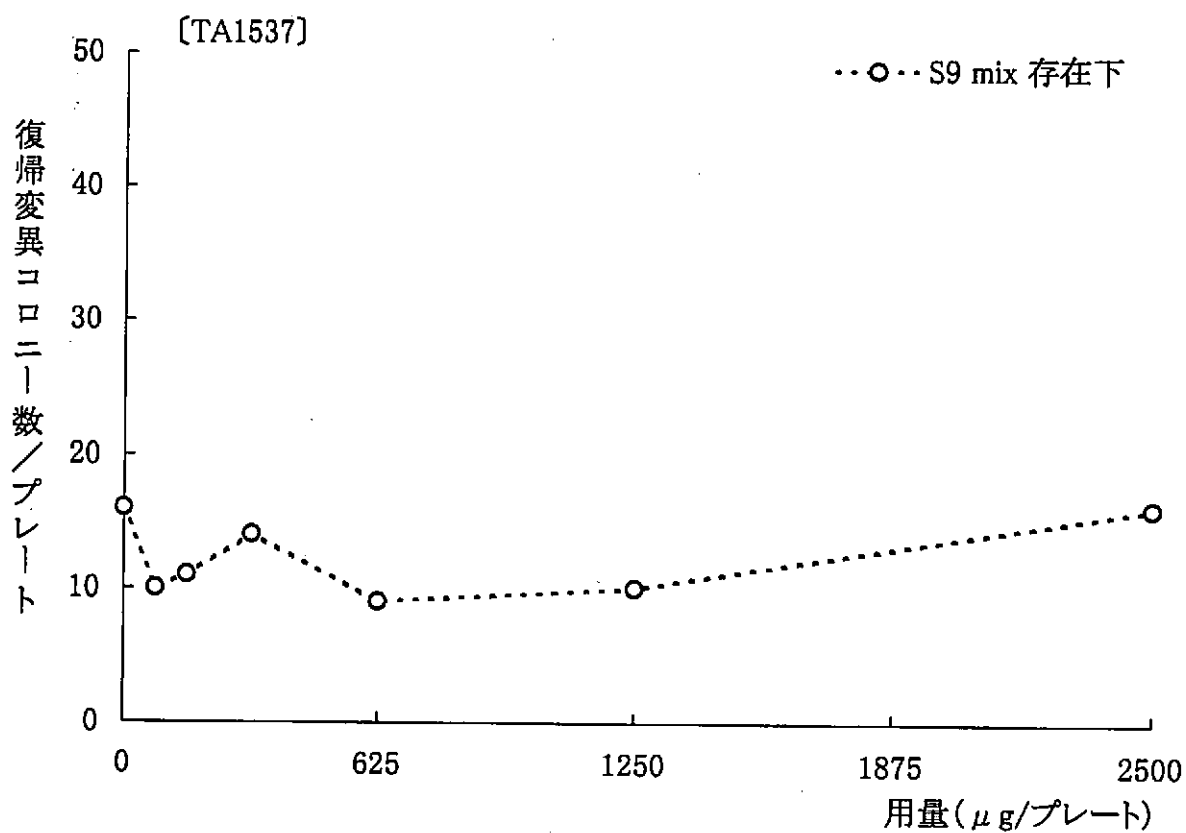
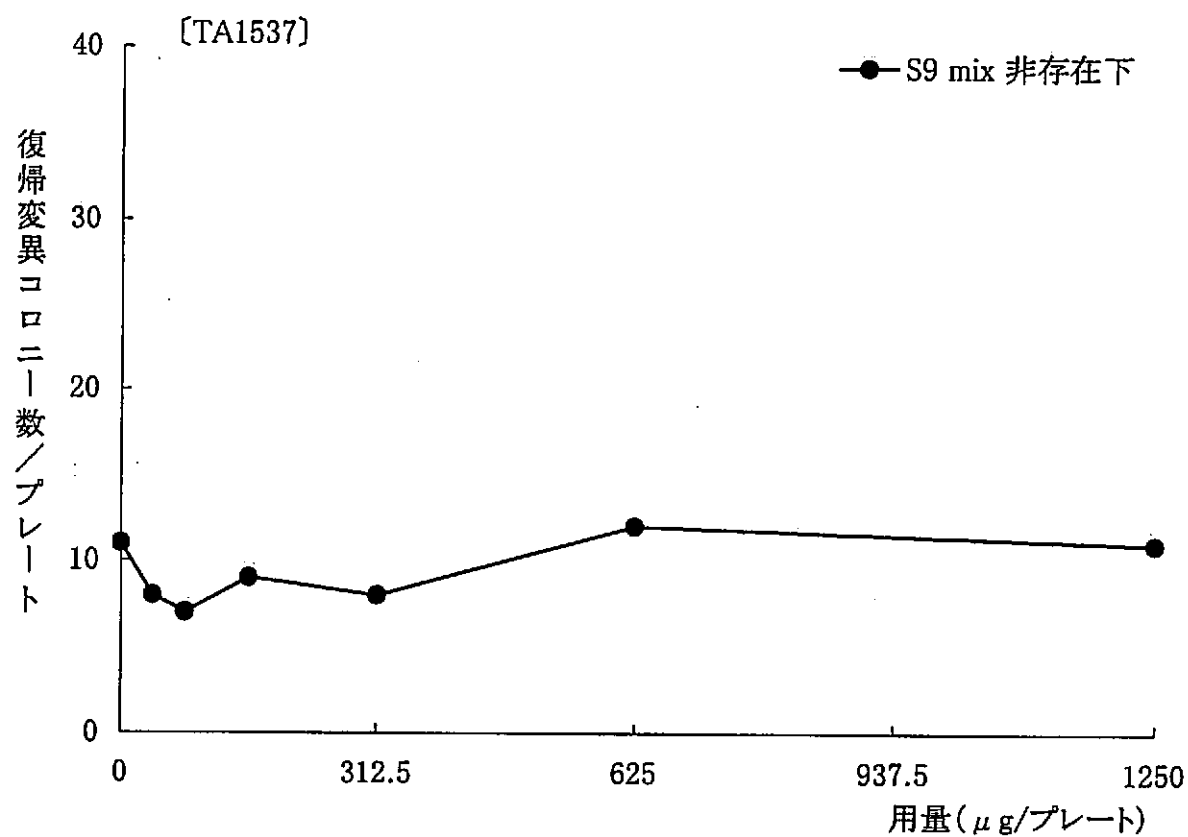


図 2-4 2,4-ジメチルアニリンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

## 陳 述 書

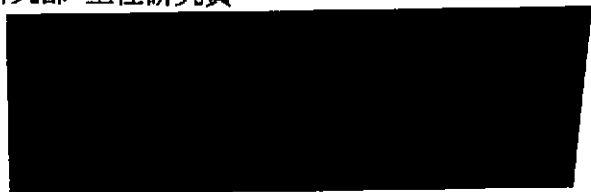
試験表題： 2, 4-ジメチルアニリンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号： 01-169

本試験は、OECD の試験法ガイドライン“OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 471, Bacterial Reverse Mutation Test(1997)” および OECD の GLP “OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(1997)” に定める基準に準拠して実施した。

試験責任者

安全性研究部 主任研究員





試験表題： 2, 4-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： 01-169

試験委託者：

名 称 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター

所 在 地 東京都渋谷区西原 2-49-10

委託責任者

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所

所 在 地 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11

運営管理者

試験責任者

信頼性保証

責 任 者

試験期間：

試験開始日 平成 13 年 12 月 21 日

実験期間 開始日：平成 14 年 1 月 8 日

終了日：平成 14 年 1 月 24 日

試験終了日 平成 14 年 月 日

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因：

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 信頼性保証に関する記録
5. 最終報告書

試験責任者、担当者および業務分担

試験責任者

氏名

試験担当者およびその業務分担

実験操作：

データ整理：



## ROBUST SUMMARY TEMPLATE

### GENETIC TOXICITY IN VITRO (BACTERIAL TEST)

#### TEST SUBSTANCE

2,4-Dimethylaniline (CAS No. 95-68-1)

Source : XXXXXXXXXX — purity : 99.1% ; Stability during use confirmed by GC.

#### METHOD

- Method/guideline : OECD Test Guidelines 471
- Test type : Reverse mutation assay
- GLP : Yes (OECD)
- Year : 2002
- Species/Strain : *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537  
*Escherichia coli* WP2uvrA
- Metabolic activation : with and without S9 mix
- Statistical methods : No

#### REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

- Study Design :
  - Concentration : without S9 mix : 0, 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250  $\mu$ g/plate (TA1537)  
0, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500  $\mu$ g/plate (TA98, TA100, TA1535, WP2uvrA)  
with S9 mix : 0, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500  $\mu$ g/plate (TA98, TA100, TA1535, TA1537)  
0, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000  $\mu$ g/plate (WP2uvrA)
  - Number of replicates : 2
  - Plates/test : 3
  - Procedure : pre-incubation method
  - Solvent : dimethyl sulfoxide
  - Positive controls : without S9 mix : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (TA100, TA98, WP2uvrA), Sodium azide (TA1535) and 9-Aminoacridine (TA1537)  
with S9 mix : 2-Aminoanthracene (all strains)

#### RESULTS

- Cytotoxic concentration : 1250 $\mu$ g/plate (TA1537) and 2500 $\mu$ g/plate (TA98, TA100, TA1535, WP2uvrA) without S9 mix, and 2500 $\mu$ g/plate (TA98, TA100, TA1535, TA1537) and 5000 $\mu$ g/plate (WP2uvrA) with S9 mix
- Genotoxic effects : positive in TA100 (78.1~2500 $\mu$ g/plate) with metabolic activation

#### CONCLUSIONS

This chemical was mutagenic in the *S.typhimurium* TA100 with metabolic activation.

#### DATA QUALITY

- Reliabilities : valid without restriction

#### REFERENCES (Free Text)

Maron, D.M. and Ames, B.N.(1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation. Research*, 113, 173-215.

Green, M.H. (1984). "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" 1, Vol. 3, eds. By Kilbey, B.J., Legator, M., Nicols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp.161-187.