

2-ピニルピリジンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：2710（115-051）

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目 次

1. 要 約	1 頁
2. 試 験 題 目	2
3. 試 験 目 的	2
4. 試 験 番 号	2
9. 被 験 物 質	3
10. 試験材料および方法	5
11. 試 験 結 果	11
12. 考察および結論	13
13. 参考とした資料	14

Figures および Tables

Figure 1	Bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine in strain TA100	16
Figure 2	Bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine in strain TA1535	17
Figure 3	Bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine in strain WP2 <i>uvrA</i>	18
Figure 4	Bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine in strain TA98	19
Figure 5	Bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine in strain TA1537	20
Figure 6	Confirmative examination of 2-Vinylpyridine in strain WP2 <i>uvrA</i>	21
Table 1	Results of the bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine (1st trial) [direct method: -S9]	22
Table 2	Results of the bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine (1st trial) [activation method: +S9]	23
Table 3	Results of the bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine (2nd trial) [direct method: -S9]	24
Table 4	Results of the bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine (2nd trial) [activation method: +S9]	25
Table 5	Results of the confirmative examination of 2-Vinylpyridine [activation method: +S9]	26

1. 要 約：

本試験条件下において2-ビニルピリジ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。

すなわち、2-ビニルピリジ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。

あらかじめ予備的な試験を実施し、本試験の用量を設定した。その結果、代謝活性化法の WP2 *uvrA* において弱いながらも復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められた。確認試験においても、同様の結果が得られた。

また、陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し直接法あるいは代謝活性化法により明確な突然変異誘発作用を示した。

2. 試験題目： 2-ビニルピリジンの細菌を用いる復帰突然変異試験
3. 試験目的： 被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討するため、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号（昭和62年3月31日）の「新規化学物質に係る試験の方法について」ならびにOECD化学品ガイドライン 471 および 472（1983年5月26日）に従って、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。
なお、試験の実施は環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」ならびにOECDのGLP（1982年）の基準を満たすものとした。
4. 試験番号： 2710（115-051）

9. 被 験 物 質：

- 1) 被験物質名 2-ビニルピリジン
- 2) CAS No. 100-69-6
- 3) ロット番号
- 4) 純 度 98.3% (その他, 不純物として2-ピコリン 0.9%, 2-エチルピリジン 0.4%および2-メチルビニルピリジン 0.4%を含む)
- 5) 製 造 元
- 6) 保 管 条 件 密封容器に入れ, -10℃以下の冷暗所に保管する.
- 7) 保 管 場 所 安評センター被験物質保管庫
- 8) 化 学 名 2-Vinylpyridine
- 9) 構 造 式
- C=CC1=CC=CN=C1
- 10) 分 子 式 C_7H_7N
- 11) 分 子 量 105.14
- 12) 物質の状態 液体
- 13) 色 淡黄色
- 14) 臭 特異臭
- 15) 沸 点 $79\sim 82^{\circ}\text{C} / 29\text{ mmHg}$
- 16) 溶 解 性 水にやや溶けにくい.
2.75 g/100 g (20℃)

- 17) 分配係数 1.54
(Octanol/Water)
- 18) 比重 0.976 (20℃)
- 19) 蒸気圧 10 mmHg (44.5℃)
- 20) 取り扱い上の注意 換気の良い場所で取り扱った。火気厳禁とした。
静電気対策としてアース取りを行った。
作業衣，作業靴は導電性のものを着用した。
皮膚，粘膜又は着衣に触れたり，目に入らないように適切な保護具を着用した。
- 21) 被験物質保管および 残余被験物質は全量保管した。
残余被験物質の処理

10. 試験材料および方法：

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種類の菌株を選択した。

- | | | | |
|----|---------|-----------------|---------------------|
| a. | ネズミチフス菌 | TA100 | (ヒスチジン要求性の塩基対置換型) |
| b. | 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) |
| c. | ネズミチフス菌 | TA1535 | (ヒスチジン要求性の塩基対置換型) |
| d. | 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) |
| e. | 大腸菌 | WP2 <i>uvrA</i> | (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 から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に から分与を受けた。平成7年9月5日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

菌株の保存に当たっては、各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド (DMSO: GC用; MERCK 社, 独国; 純度 99.7%以上, Lot No. K21387978 513) 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-390AT; 三洋電機特機株式会社, 大阪府守口市) に -80℃ で保存した。

2) 培地の調製

a. 最少グルコース寒天平板培地 (プレート)

日清製粉株式会社 (東京都中央区) 製のテスメディア AN培地 (Lot No. AN570HK, 平成7年8月1日製造) を購入後、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地 E を含む下記の組成の溶液 30 ml を無菌的にシャーレに分注したものである。

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
精製水	200	ml
<hr/>		
グルコース	20	g
精製水	100	ml
<hr/>		
寒天 (No. 1; OXOID 社, 英国; Lot No. 87286)	15	g
精製水	700	ml

b. トップアガー（軟寒天）

寒天（Bacto-agar：DIFCO社，米国；Lot No. 43344AJA）0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム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 mM L-ヒスチジン（関東化学株式会社，東京都中央区；Lot No. 412E1389）- 0.5 mM D-ビオチン（関東化学株式会社，Lot No. 705S1379）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 mM L-トリプトファン（関東化学株式会社，Lot No. 608E1385）水溶液を同じく1容量加えた。

3) 試験菌株の前培養

内容量 200 ml の円筒容器に 2.5%ニュートリエントプロス（OXOID社：No. 2；Lot No. 154 52789）溶液を 25 ml 分注し，これに凍結保存した菌懸濁液を融解した後，マイクロピペットを用いて 50 μ l 接種した。培養開始までの間冷却ユニット（ECS-1：東京理化学株式会社，東京都中央区）を用いて 4℃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，埼玉県越谷市）を用い，37℃で8時間振盪（往復振盪：120回/分）培養した。培養終了後の菌懸濁液を使用時まで氷水中に保存した。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，千葉県野田市）を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試 験	生 菌 数 ($\times 10^9$ /ml)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
本試験(1回目)	5.53	6.64	5.77	5.06	2.23
本試験(2回目)	3.92	3.90	4.30	4.04	1.98
確 認 試 験	-	-	5.72	-	-

4) S 9 m i x

キッコーマン株式会社製の S 9 m i x (Lot No. FSM-333 および FSM-335) を試験に使用した。なお、製造後 6 ヶ月以内の S 9 m i x を使用した。

S 9 調製の際の誘導物質、誘導方法等ならびに S 9 m i x の組成を以下に示した。

本 試 験		確 認 試 験
a. ロット番号	R A A - 3 3 3	R A A - 3 3 5
b. 製 造 日	平成 7 年 9 月 8 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)	平成 7 年 10 月 13 日
c. 使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系	同左
d. 週 / 週 齢	雄 / 7 週 齢	同左
e. 体 重	182 ~ 225 g	193 ~ 228 g
f. 誘 導 物 質	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)	同左
g. 投 与 量 および回数	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)	同左
h. 投 与 方 法	腹腔内投与	同左
i. 蛋 白 含 量	24.9 mg/ml	26.4 mg/ml

成 分	S 9 m i x 1 ml 中の量
S 9	0.1 ml
M g C l ₂	8 μmol
K C l	33 μmol
G - 6 - P	5 μmol
N A D P H	4 μmol
N A D H	4 μmol
N a - リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
精製水	残 量

5) 被験物質溶液の調製

被験物質を DMSO (Lot No. K21387978 513) に溶解させ調製原液とした。この調製原液を所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。

6) 対照群

a. 溶媒対照

溶媒対照として、使用溶媒の DMSO のみで試験した。

b. 陽性対照

DMSO (Lot No. K20471078 429 あるいは K21387978 513) を用いて陽性対照物質を溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存 (-20℃) した。これを融解した後、試験に用いた。

各菌株について、下記に示した用量で試験した。これらの試験用量は、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。

《直接法》	菌 株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	AF-2	0.01 μg/プレート
”	TA98	”	0.1 ”
”	TA1535	NaN ₃	0.5 ”
”	TA1537	ACR	80 ”
大 腸 菌	WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01 ”
《代謝活性化法》	菌 株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	2-AA	1 μg/プレート
”	TA98	”	0.5 ”
”	TA1535	”	2 ”
”	TA1537	”	2 ”
大 腸 菌	WP2 <i>uvrA</i>	”	10 ”

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、大阪府大阪市；純度 98.0~102.0%，Lot No. PTQ1296)

NaN₃：アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社；純度 99.0%以上，Lot No. APH4078)

ACR：9-アミノアクリジン (ALDRICH 社，米国；純度 98.0%，Lot No. CP01604TM)

2-AA：2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社；純度 90.0%以上，Lot No. DCL3789)

c. 無菌試験

被験物質溶液（調製原液）ならびに S 9 m i x について無菌試験を実施した。すなわち、100 μ l の調製原液あるいは 100 μ l の S 9 m i x にトッパアガー 2 ml を添加し、プレート上に注いだ。37 $^{\circ}$ C 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 S 9 m i x のいずれについても 1 枚のプレートを用い、試験毎に本無菌試験を実施した。

7) A M E S 試験

a. 試験用量

1 枚のプレートを用いて実施した予備的な試験結果を以下に示す。

試験用量 (μ g/プレート)	S 9 m i x	復 帰 突 然 変 異 コ 口 ニ ー 数				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
0	-	118	8	14	12	4
4.88	-	117	11	19	13	5
19.5	-	107	9	14	18	7
78.1	-	119	5	20	23	3
313	-	113	6	19	11	6
1250	-	93*	5*	39	23	13
0	+	143	13	21	16	7
4.88	+	135	11	20	11	10
19.5	+	141	9	23	16	10
78.1	+	113	8	22	19	9
313	+	132	13	21	15	8
1250	+	111	10	31	18	11

*：試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。

本結果を基に、本試験においては以下に示した用量を最高用量とし、それぞれ 6～7 用量（公比 2）を設定した。

試 験	最 高 用 量 (μ g/プレート)				
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
直 接 法	2500	2500	5000	5000	5000
代謝活性化法	5000	5000	5000	5000	5000

また、確認試験では 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 および 5000 μ g/ml の 6 用量（公差 500）を設定した。

b. 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、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を $100\mu\text{l}$ 、次いで直接法の場合、 0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) を $500\mu\text{l}$ 、代謝活性化法の場合、 S9 mix を $500\mu\text{l}$ 分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 $100\mu\text{l}$ を加えた後、振盪恒温器 (M-100^{N} ：タイテック株式会社) を用いて 37°C で20分間振盪培養 (プレーンキュベーション) した。培養終了後、トッパアガーを 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。重層したトッパアガーが固化した後、恒温器を用いて 37°C の条件で48時間各プレートを培養した。

1用量当たり3枚のプレートを用いた。

独立して試験を2回繰り返して実施した。

c. コロニー数計測

被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株の生育状態について実体顕微鏡 ($\times 60$) 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数した。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、東京都福生市) 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。

8) 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存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。

9) 比活性の算出

当該用量における誘発コロニー数 (当該用量のコロニー数 - 溶媒対照でのコロニー数) を試験用量 ($\text{mg}/\text{プレート}$) で除すことにより比活性を算出した。各試験系、各菌株の算出結果のうち、最も高い値を本被験物質の比活性とした。

11. 試験結果：

1) 本試験（1回目）

各用量における復帰突然変異コロニー数を Figure 1~5 および Table 1~2 に示した。

直接法（-S9）ならびに代謝活性化法（+S9）のいずれとも高用量群において、2-ビニルピリジン処理による生育阻害作用が観察された。

また、代謝活性化法の WP2 *uvrA* では試験用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められ、5000 μg /プレートでは溶媒対照のコロニー数の2.6倍を示した。陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。

なお、コロニー計数時を含めた試験期間中、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

2) 本試験（2回目）

各用量における復帰突然変異コロニー数を Figure 1~5 および Table 3~4 に示した。

2-ビニルピリジン処理による生育阻害作用は、各試験系、各菌株の高用量において観察された。

また、1回目の試験で陽性反応が認められた代謝活性化法の WP2 *uvrA* では、復帰突然変異コロニー数の増加傾向は認められたものの溶媒対照の2倍を超えることはなかった。

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。

なお、コロニー計数時を含めた試験期間中、特筆すべき変化は観察されなかった。

3) 確認試験

代謝活性化法，WP2 *uvrA* における判定結果に差異が認められた。従って，再現性を確認するため同菌株を用いた確認試験を実施した。

確認試験結果を Figure 6 および Table 5 に示した。

2500 ならびに 3000 μg /プレートにおいて復帰突然変異コロニー数が溶媒対照の 2 倍を超えており，陽性反応が確認された。

変異原性の強さに関する相対的比較値である比活性 (mg 当たり) は，以下の通りである。

試 験	S 9	菌株	試験用量	比 活 性
本試験 (1 回目)	+	WP2 <i>uvrA</i>	5000 μg /プレート	7.6
確 認 試 験	+	WP2 <i>uvrA</i>	3000 μg /プレート	10.7

以上，本試験および確認試験において，直接法および代謝活性化法の両試験とも再現性が確認された。

また，2-ビニルピリジン調製原液ならびに S 9 m i x の無菌試験において，菌の増殖は認められなかった。

12. 考察および結論：

2-ビニルピリジンの変異原性，すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため，微生物（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。

最高用量として試験菌株の生育を阻害する用量あるいは 5000 μg /プレートまで検討した。その結果，2-ビニルピリジン処理群では代謝活性化法の WP2 *uvrA* において僅かではあるが用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められた。2回繰り返して実施した試験において，明確に陽性と判定できなかつたため WP2 *uvrA* について確認試験を実施した。2-ビニルピリジン処理により，溶媒対照の2倍を超える復帰突然変異コロニーを誘発したことから陽性反応と考えられた。

また，変異原性の強さに関する相対的比較値である比活性は 10.7と算出され，既知変異原性物質に比較して2-ビニルピリジンの変異原性が大変弱いことを示していた。なお，溶媒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-ビニルピリジンの微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定した。

13. 参考とした資料：

- ・ Ames, B. N., Lee, F. D. and Durston, W. E. : An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 782~786, 1973.
- ・ Ames, B. N. *et al* , : Carcinogens are mutagens : A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 2, 281 ~ 2, 285, 1973.
- ・ Ames B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mut. Res., 31, 347 ~ 364, 1975.
- ・ 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について, 蛋白質・核酸・酵素, 20 (13) , 16 ~ 27, 1975.
- ・ 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ーテストガイドラインとGLPー, 中央労働災害防止協会, 1991.
- ・ 石館 基 監修： 微生物を用いる変異原性試験データ集, エル・アイ・シー, 1991.

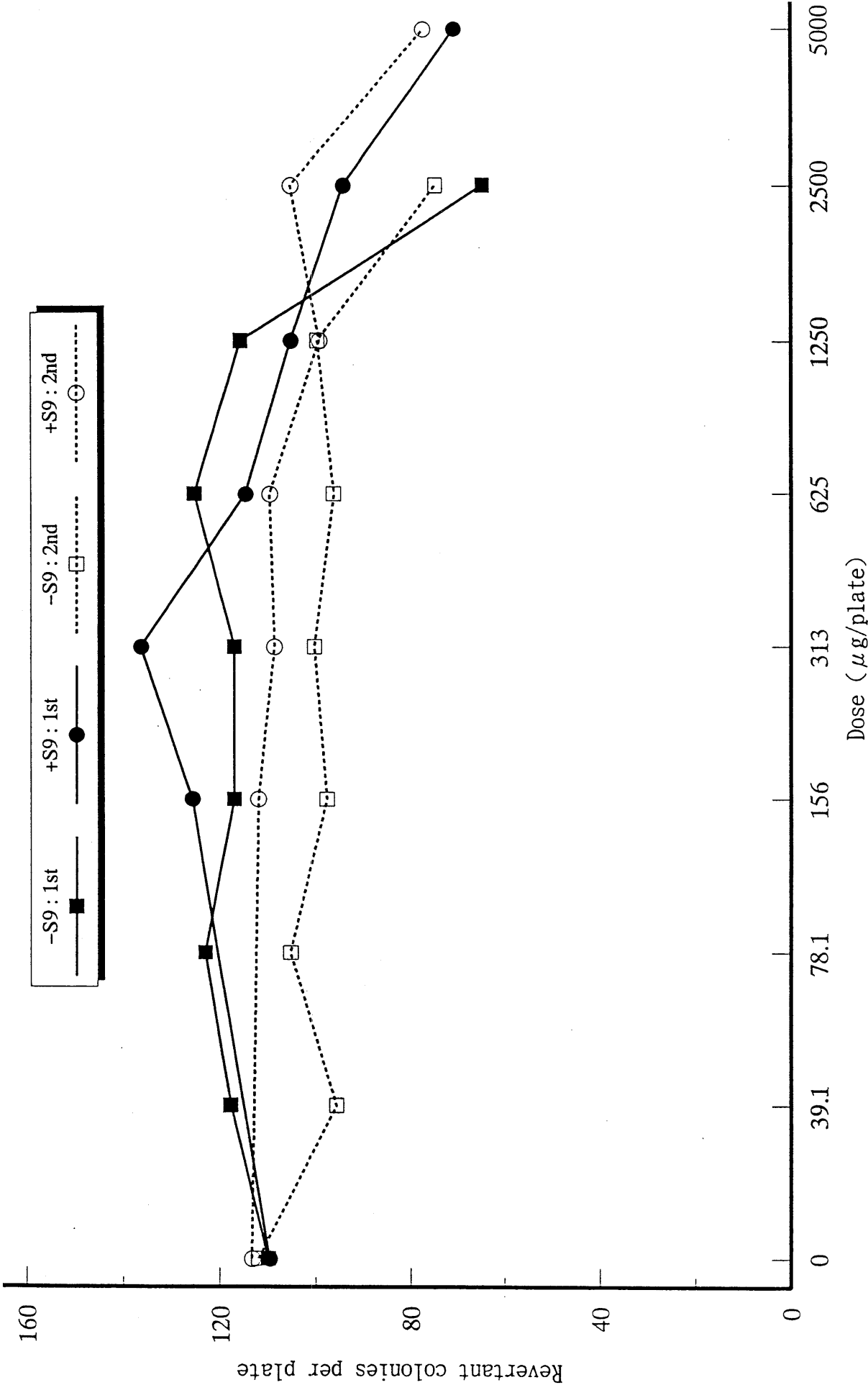


Figure 1. Bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine in strain TA100

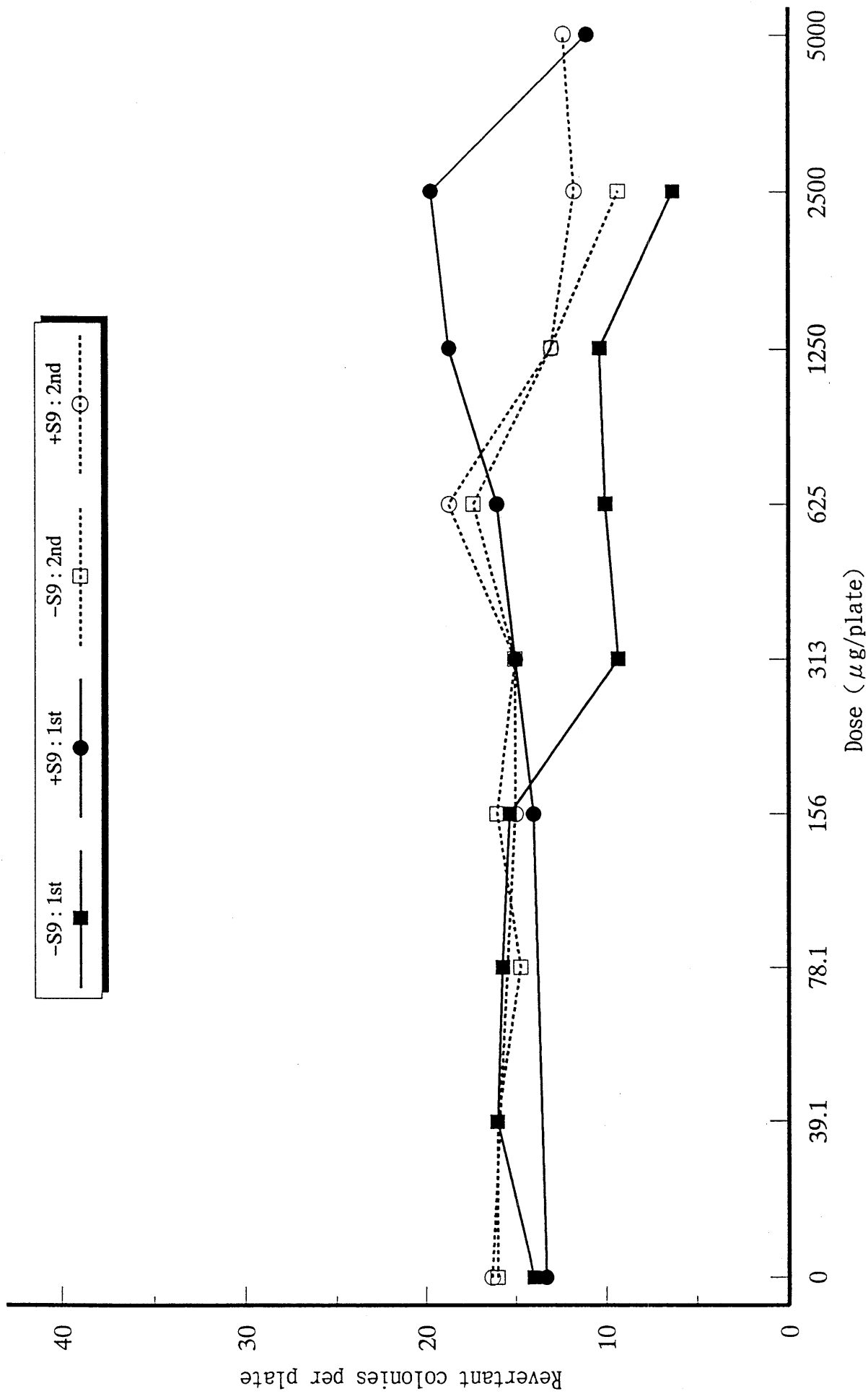


Figure 2. Bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine in strain TA1535

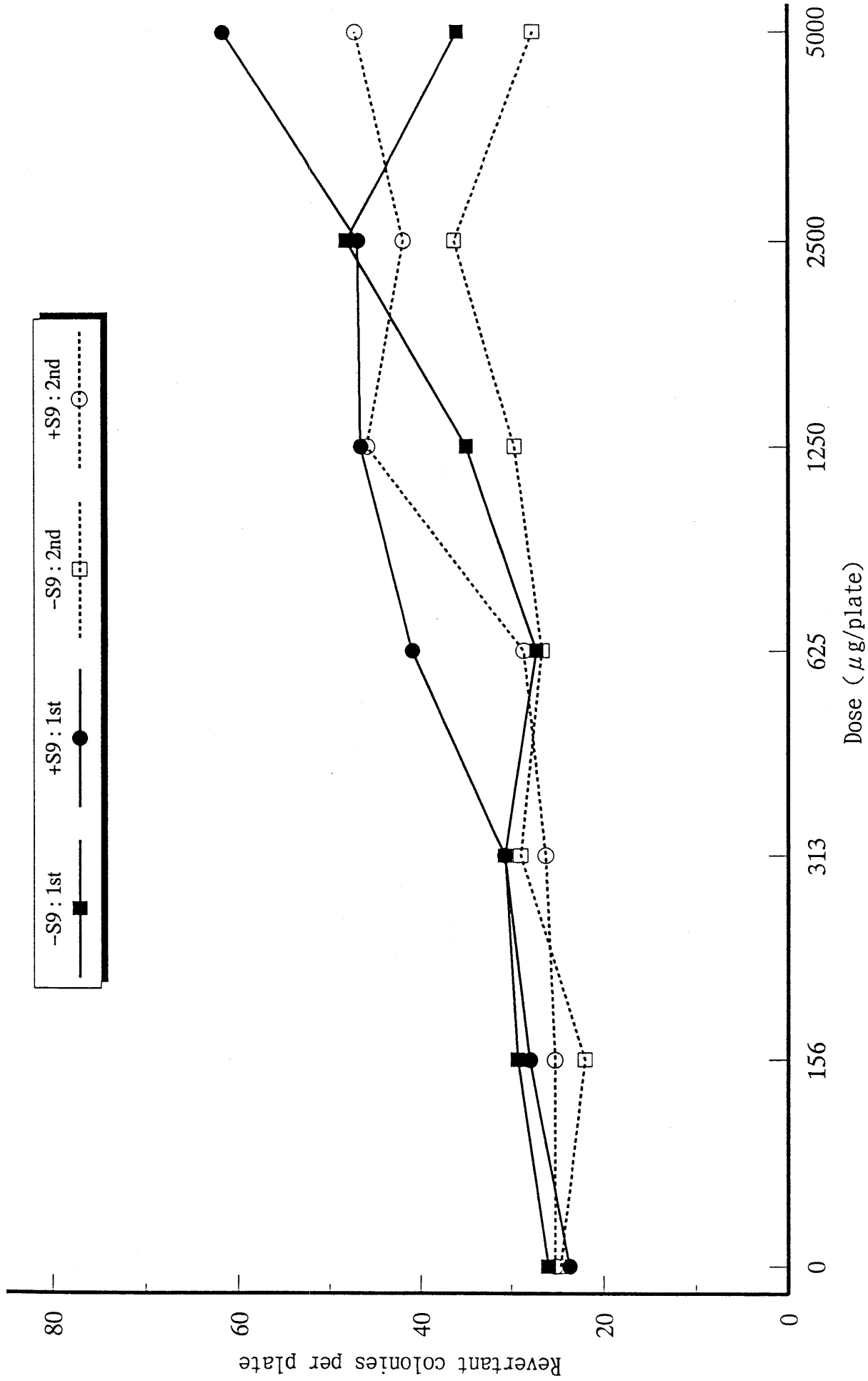


Figure 3. Bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine in strain WP2 *uvrA*

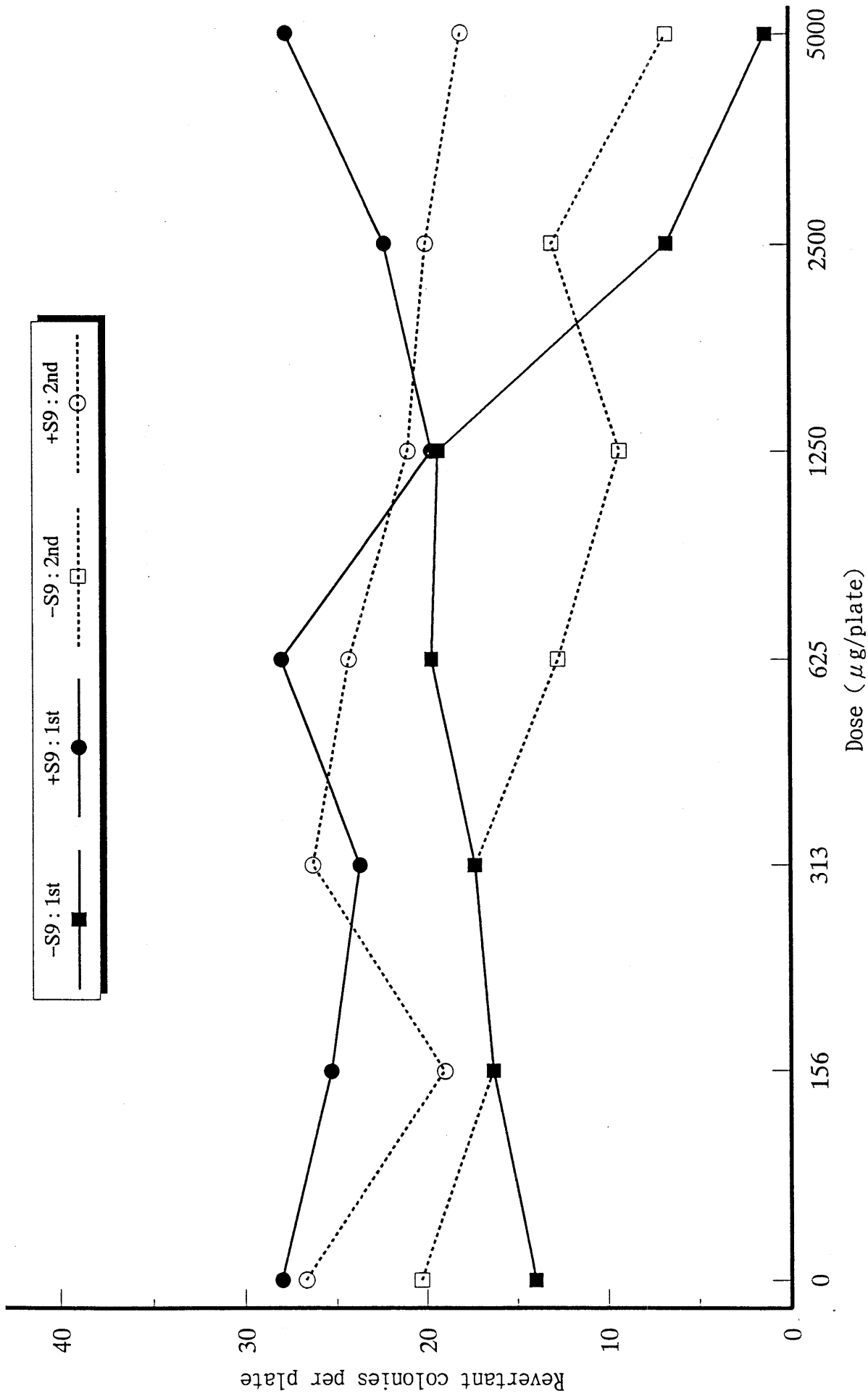


Figure 4. Bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine in strain TA98

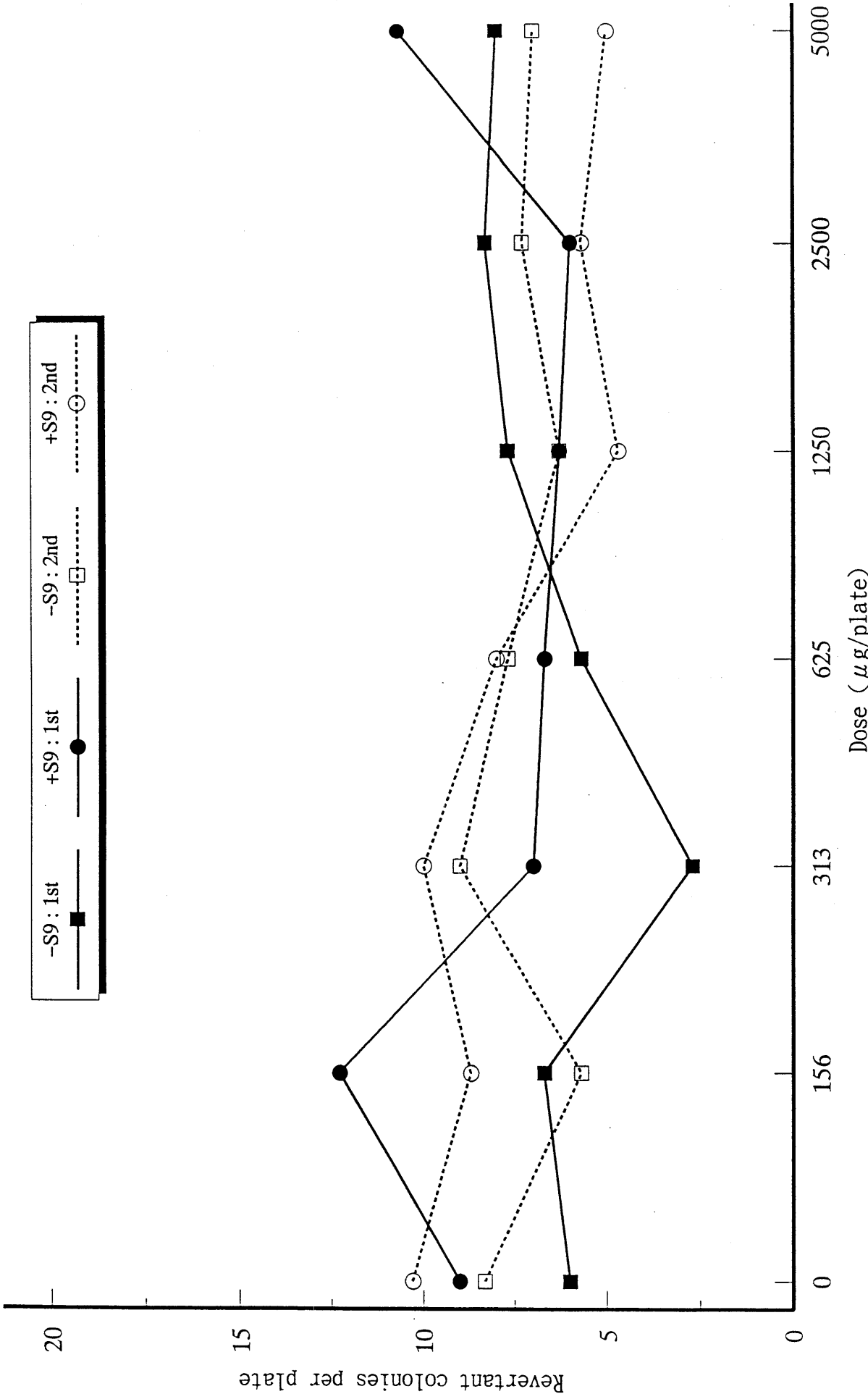


Figure 5. Bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine in strain TA1537

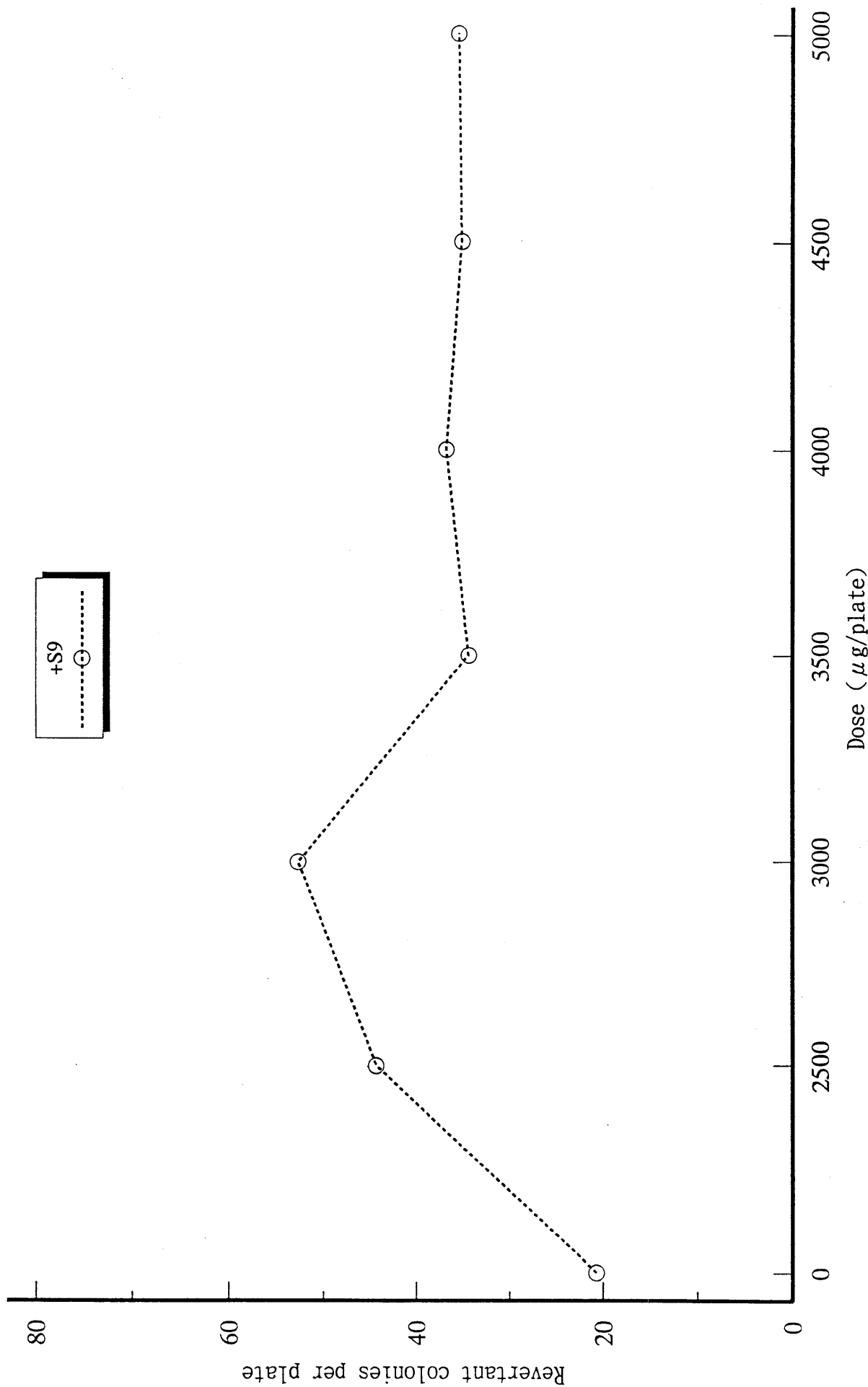


Figure 6. Confirmative examination of 2-Vinylpyridine in strain WP2 *uvrA*

Table I. Results of the bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine (1st trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]					
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
DMSO #	0	105 117 108 [110 \pm 6]	15 11 16 [14 \pm 3]	31 26 21 [26 \pm 5]	11 13 18 [14 \pm 4]	7 4 7 [6 \pm 2]	
2-Vinylpyridine	39.1	126 109 118 [118 \pm 9]	16 17 15 [16 \pm 1]	-	-	-	
	78.1	122 118 129 [123 \pm 6]	15 20 12 [16 \pm 4]	-	-	-	
	156	133 111 107 [117 \pm 14]	12 16 18 [15 \pm 3]	29 28 31 [29 \pm 2]	18 17 14 [16 \pm 2]	4 7 9 [7 \pm 3]	
	313	107 134 110 [117 \pm 15]	5 12 11 [9 \pm 4]	25 37 30 [31 \pm 6]	20 15 17 [17 \pm 3]	1 3 4 [3 \pm 2]	
	625	132 136 108 [125 \pm 15]	8 8 14 [10 \pm 3]	30 26 26 [27 \pm 2]	18 21 20 [20 \pm 2]	6 5 6 [6 \pm 1]	
	1250	117 121 109 [116 \pm 6]	8 13 10 [10 \pm 3]	34 37 34 [35 \pm 2]	21 17 20 [19 \pm 2]	7 7 9 [8 \pm 1]	
	2500	44* 74* 76* [65 \pm 18]	4* 9* 6* [6 \pm 3]	48 49 48 [48 \pm 1]	6 5 9 [7 \pm 2]	7 9 9 [8 \pm 1]	
	5000	-	-	33* 39* 36* [36 \pm 3]	1* 3* 0* [1 \pm 2]	8* 8* 8* [8 \pm 0]	
Positive control		416 421 428 ^{a)} [422 \pm 6]	399 352 388 ^{b)} [380 \pm 25]	132 128 124 ^{a)} [128 \pm 4]	633 604 658 ^{c)} [632 \pm 27]	645 586 574 ^{d)} [602 \pm 38]	

#: Solvent control * : Toxic effect was observed - : Not tested
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/plate c): AF-2, 0.1 μ g/plate
d): ACR; 9-Aminoacridine, 80 μ g/plate

Table 2. Results of the bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine (1st trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]											
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537							
DMSO #	0	103 [110 \pm 6]	15 [13 \pm 5]	8 [8 \pm 5]	17 [17 \pm 5]	20 [24 \pm 3]	25 [25 \pm 3]	30 [28 \pm 2]	28 [28 \pm 2]	26 [26 \pm 2]	6 [6 \pm 3]	10 [10 \pm 3]	11 [11 \pm 3]
2-Vinylpyridine	156	120 [126 \pm 13]	12 [14 \pm 3]	13 [13 \pm 3]	17 [17 \pm 3]	31 [28 \pm 5]	22 [22 \pm 5]	30 [25 \pm 7]	17 [17 \pm 7]	29 [29 \pm 7]	13 [12 \pm 1]	13 [13 \pm 1]	11 [11 \pm 1]
	313	131 [136 \pm 10]	18 [15 \pm 3]	12 [12 \pm 3]	15 [15 \pm 3]	33 [31 \pm 3]	31 [31 \pm 3]	28 [24 \pm 4]	21 [21 \pm 4]	22 [22 \pm 4]	7 [7 \pm 2]	5 [5 \pm 2]	9 [9 \pm 2]
	625	113 [115 \pm 3]	14 [16 \pm 2]	16 [16 \pm 2]	18 [18 \pm 2]	41 [41 \pm 0]	41 [41 \pm 0]	23 [28 \pm 4]	31 [31 \pm 4]	30 [30 \pm 4]	9 [7 \pm 2]	6 [6 \pm 2]	5 [5 \pm 2]
	1250	107 [105 \pm 2]	20 [19 \pm 2]	20 [20 \pm 2]	16 [16 \pm 2]	45 [47 \pm 8]	55 [55 \pm 8]	15 [20 \pm 4]	22 [22 \pm 4]	22 [22 \pm 4]	7 [6 \pm 1]	6 [6 \pm 1]	6 [6 \pm 1]
	2500	85* [94 \pm 10]	93* [20 \pm 3]	105* [20 \pm 3]	22* [22 \pm 3]	43 [47 \pm 7]	43 [43 \pm 7]	29 [22 \pm 6]	19 [19 \pm 6]	19 [19 \pm 6]	5* [6 \pm 2]	8* [8 \pm 2]	5* [5 \pm 2]
	5000	88* [71 \pm 16]	67* [11 \pm 5]	57* [11 \pm 5]	15* [15 \pm 5]	65* [62 \pm 4]	65* [62 \pm 4]	28* [28 \pm 4]	31* [31 \pm 4]	24* [24 \pm 4]	9* [11 \pm 4]	8* [8 \pm 4]	15* [15 \pm 4]
Positive control		763 [807 \pm 40]	842 [307 \pm 10]	816 ^{a)} [304 \pm 10]	299 ^{b)} [299 \pm 10]	956 [930 \pm 24]	909 ^{c)} [909 \pm 24]	391 [406 \pm 23]	394 [394 \pm 23]	433 ^{d)} [433 \pm 23]	131 [128 \pm 6]	121 [121 \pm 6]	133 ^{b)} [133 \pm 6]

#: Solvent control * : Toxic effect was observed

a): 2AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plateb): 2AA, 2 μ g/platec): 2AA, 10 μ g/plated): 2AA, 0.5 μ g/plate

Table 3. Results of the bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]									
		TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
DMSO #	0	118 [112 \pm 7]	105 113	17 [16 \pm 2]	17 14	29 [25 \pm 4]	22 23	17 [20 \pm 3]	22 22	8 [8 \pm 2]	7 10
2-Vinylpyridine	39.1	93 [96 \pm 5]	101 93	14 [16 \pm 2]	16 18	-	-	-	-	-	-
	78.1	108 [105 \pm 10]	94 114	13 [15 \pm 4]	19 12	-	-	-	-	-	-
	156	97 [98 \pm 6]	92 104	17 [16 \pm 4]	19 12	22 [22 \pm 1]	23	17 [16 \pm 3]	19 13	4 [6 \pm 2]	6 7
	313	88 [100 \pm 11]	103 110	18 [15 \pm 3]	14 3]	31 [29 \pm 6]	34	16 [17 \pm 1]	18 11]	9 [9 \pm 1]	10 8
	625	97 [96 \pm 10]	86 106	20 [17 \pm 3]	15 17	29 [27 \pm 2]	26	10 [13 \pm 2]	14 14	7 [8 \pm 3]	11 5
	1250	106 [100 \pm 6]	96 97	17 [13 \pm 4]	10 12	24 [30 \pm 6]	29	8 [9 \pm 2]	12 8	9 [6 \pm 2]	5 2]
	2500	77* [75 \pm 2]	74* 73*	8* [9 \pm 2]	9* 11*	37 [36 \pm 1]	36	12 [13 \pm 4]	10 17	8 [7 \pm 1]	7 7
	5000	-	-	-	-	27* [28 \pm 1]	29*	5* [7 \pm 2]	8* 7*	6* [7 \pm 2]	9* 6*
Positive control		479 [472 \pm 6]	467 469 ^{a)}	428 [413 \pm 13]	402 409 ^{b)}	152 [148 \pm 9]	138 ^{a)}	679 [657 \pm 28]	626 666 ^{c)}	591 [628 \pm 36]	630 ^{d)}

#: Solvent control

*: Toxic effect was observed

-: Not tested

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plateb): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/platec): AF-2, 0.1 μ g/plated): ACR; 9-Aminoacridine, 80 μ g/plate

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 2-Vinylpyridine (2nd trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S. D.]												
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537								
DMSO #	0	114	113	113	17	21	27	28	29	26	25	9	11	11
		[113 \pm 1]	[16 \pm 3]	[25 \pm 4]	[27 \pm 3]	[25 \pm 2]	[27 \pm 4]	[27 \pm 2]	[27 \pm 2]	[27 \pm 2]	[27 \pm 2]	[27 \pm 2]	[10 \pm 1]	[10 \pm 1]
2-Vinylpyridine	156	114	113	109	12	25	24	27	24	13	20	9	7	10
		[112 \pm 3]	[15 \pm 4]	[25 \pm 2]	[12 \pm 4]	[25 \pm 2]	[24 \pm 2]	[27 \pm 2]	[19 \pm 6]	[19 \pm 6]	[13 \pm 2]	[20 \pm 6]	[9 \pm 2]	[7 \pm 2]
	313	109	97	120	14	25	25	29	21	31	27	9	11	10
		[109 \pm 12]	[109 \pm 12]	[15 \pm 3]	[14 \pm 3]	[26 \pm 2]	[25 \pm 2]	[29 \pm 2]	[26 \pm 5]	[26 \pm 5]	[31 \pm 5]	[27 \pm 5]	[10 \pm 1]	[11 \pm 1]
	625	103	113	113	20	30	26	30	30	20	23	9	6	9
		[110 \pm 6]	[19 \pm 2]	[29 \pm 2]	[20 \pm 2]	[29 \pm 2]	[26 \pm 2]	[30 \pm 2]	[24 \pm 5]	[20 \pm 5]	[20 \pm 5]	[23 \pm 5]	[8 \pm 2]	[6 \pm 2]
	1250	104	100	94	9	48	50	40	22	18	23	6	4	4
		[99 \pm 5]	[13 \pm 4]	[46 \pm 5]	[9 \pm 4]	[46 \pm 5]	[50 \pm 5]	[40 \pm 5]	[21 \pm 3]	[18 \pm 3]	[23 \pm 3]	[4 \pm 1]	[5 \pm 1]	[4 \pm 1]
	2500	116*	104*	96*	16*	39	42	45	21	19	20	7*	7*	3*
		[105 \pm 10]	[12 \pm 4]	[42 \pm 3]	[16* \pm 4]	[42 \pm 3]	[45 \pm 3]	[20 \pm 1]	[20 \pm 1]	[19 \pm 1]	[20 \pm 1]	[20 \pm 1]	[6 \pm 2]	[7* \pm 2]
	5000	82*	78*	72*	15*	40*	47*	55*	17*	18*	19*	7*	4*	4*
		[77 \pm 5]	[12 \pm 3]	[47 \pm 8]	[15* \pm 3]	[47 \pm 8]	[55* \pm 8]	[19* \pm 1]	[18 \pm 1]	[18 \pm 1]	[18* \pm 1]	[19* \pm 1]	[4* \pm 2]	[4* \pm 2]
Positive control		812	799	765 ^{a)}	339 ^{b)}	932	929	907 ^{c)}	398	413	398 ^{d)}	119	129	127 ^{b)}
		[792 \pm 24]	[331 \pm 27]	[301 \pm 352]	[339 \pm 27]	[923 \pm 14]	[907 \pm 14]	[403 \pm 9]	[125 \pm 5]	[125 \pm 5]	[125 \pm 5]	[125 \pm 5]	[125 \pm 5]	[125 \pm 5]

#: Solvent control *: Toxic effect was observed

a): 2AA: 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 5. Results of the confirmative examination of 2-Vinylpyridine
[activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S. D.]			
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98
DMSO #	0	-	-	24 19 19 [21 \pm 3]	-
2-Vinylpyridine	2500	-	-	45 49 39 [44 \pm 5]	-
	3000	-	-	50 61 47 [53 \pm 7]	-
	3500	-	-	37 30 36 [34 \pm 4]	-
	4000	-	-	41 35 34 [37 \pm 4]	-
	4500	-	-	35 34 36 [35 \pm 1]	-
5000	-	-	35* 33* 38* [35 \pm 3]	-	
Positive control			900 877 860 ^{a)} [879 \pm 20]		

#: Solvent control *: Toxic effect was observed -: Not tested
a): 2AA; 2-Aminoanthracene, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$