
4-メチルピリジンの細菌を用いる復帰突然変異試験

最終報告書

作成日: 2011年3月29日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

1. 目次

表紙..... 1
 1. 目次..... 2

15. 要約..... 11
 16. 緒言..... 12
 17. 方法..... 12
 17.1. 被験物質，媒体，陽性対照物質及び陰性対照物質..... 12
 17.1.1. 被験物質..... 12
 17.1.2. 媒体..... 12
 17.1.3. 陽性対照物質..... 12
 17.1.4. 陰性対照物質..... 13
 17.2. 検体液..... 14
 17.2.1. 被験物質..... 14
 17.2.2. 陽性対照物質..... 14
 17.2.3. 残余検体液の取り扱い..... 14
 17.3. 試験系..... 15
 17.3.1. 試験菌株..... 15
 18. S9 mix 16
 19. 培地..... 16
 20. 無菌試験..... 16
 21. 試験方法..... 17
 21.1. 試験操作..... 17

21.2. 用量設定試験.....	17
21.3. 本試験.....	17
22. 試験の成立条件.....	17
23. 統計学的方法.....	18
24. 判定基準.....	18
25. 試験結果.....	19
25.1. 用量設定試験.....	19
25.1.1. プレート上の析出物.....	19
25.1.2. 菌の生育阻害.....	19
25.1.3. 復帰変異コロニー数.....	19
25.1.4. 対照物質.....	19
25.2. 本試験.....	19
25.2.1. プレート上の析出物.....	19
25.2.2. 菌の生育阻害.....	19
25.2.3. 復帰変異コロニー数.....	19
25.2.4. 対照物質.....	19
26. 考 察.....	20
27. 文 献.....	20

Tables

Table 1-1, 1-2. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria (dose-finding test).....	21
Table 2-1, 2-2. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria (mutagenicity test).....	23

Figures

Figure 1. Chemical structure of 4-methylpyridine.....	25
Figure 2-1. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria. (dose-finding test: without S9 mix).....	26
Figure 2-2. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria. (dose-finding test: with S9 mix).....	27
Figure 3-1. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria. (mutagenicity test: without S9 mix).....	28
Figure 3-2. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria. (mutagenicity test: with S9 mix).....	29

15. 要 約

4-メチルピリジンの遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium* の TA100, TA98, TA1535 及び TA1537 並びに *Escherichia coli* の WP2uvrA を用い、プレートインキュベーション法による復帰突然変異試験により検討した。試験は、S9 mix 無添加と S9 mix 添加について実施した。

4-メチルピリジン処理群における試験濃度は、用量設定試験では、S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、いずれの菌株も 5, 15, 50, 150, 500, 1500 及び 5000 µg/plate を設定した。

用量設定試験の結果、いずれの菌株とも、菌の生育阻害及び復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、本試験では、用量設定試験と同様に 5000 µg/plate を最高濃度として、以下公比2で計5濃度を設定した。すなわち、S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、いずれの菌株も 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate とした。

試験の結果、復帰変異コロニー数は、いずれの菌株とも S9 mix 無添加及び S9 mix 添加にかかわらず、陰性対照の2倍以上の増加はみられなかった。

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均±2 S.D.の範囲内であった。

用量設定試験及び本試験の結果には再現性が認められた。

以上の結果、当試験の条件下において、4-メチルピリジンに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。

16. 緒言

4-メチルピリジンの細菌を用いる復帰突然変異試験を行い、その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した。

17. 方法

17.1. 被験物質, 媒体, 陽性対照物質及び陰性対照物質

17.1.1. 被験物質

被験物質 4-メチルピリジン[別名: γ -ピコリン, 英語名称: 4-methylpyridine, CAS No.: 108-89-4, 官報公示整理番号 (化審法): 5-711] は, 化学式: C_6H_7N (化学構造式は Figure 1. 参照), 分子量: 93.13, 物性・性状: ごくうすい黄色澄明の液体であり, やや甘い不快臭を有する. 水, エタノール及びアセトンに極めて溶けやすい. 引火点: 55°C, 密度 (20°C): 0.954 g/mL である. 当試験には,

入手したものをを用いた [

純度 (キャピラリーカラム GC): 99.0%]. 入手後は, 試験施設の被験物質保管室の室温保管庫 [設定温度: 23°C (実測値: 22.0–25.0°C), 設定湿度: 55% (実測値: 40.8–67.0%)] 内に, 室温・遮光・気密 (アルコンガス充填) の条件下で保管した.

「4-メチルピリジンのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験」(試験番号: 100530) の投与期間終了後に試験施設で保管した被験物質 (Lot No.: STN0098) を製造元で再分析し, 使用期間中の安定性を確認した.

17.1.2. 媒体

媒体には, 注射用水 (規格: 局方品, Lot No.: K0A81, 使用期限: 2013 年 1 月, 株式会社大塚製薬工場) を用いた. 注射用水は, 使用時まで試験施設の被験物質保管室 [設定温度: 23°C (実測値: 22.0–24.8°C), 設定湿度: 55% (実測値: 40.8–57.3%)] 内に, 室温の条件下で保管した.

17.1.3. 陽性対照物質

陽性対照物質は, ポジコン AM マルチセット (セット番号: M0023, 使用期限: 2011 年 12 月 9 日, 製造元: オリエンタル酵母工業株式会社) を用いた. ポジコン AM マルチセットは, 試験施設の被験物質保管室の保管庫 [冷凍庫: MDF-291AT, 三洋電機株式会社, 設定温度: -85°C (実測値: -87–-79°C)] 内に, 冷凍の条件下で保管した.

下記にポジコン AM マルチセットの内容を記載した.

17.1.3.1. 2-アミノアントラセン (2-aminoanthracene, 略名: 2AA)

調製液

5 μ g/mL (Lot No.: 100510A205), 10 μ g/mL (Lot No.: 100510A210),
20 μ g/mL (Lot No.: 100510A220), 100 μ g/mL (Lot No.: 100510A2100)

製造日: 2010 年 5 月 10 日

媒体: ジメチルスルホキシド (以下 DMSO, 紫外外部吸収スペクトル用, Lot No.: JK066, 株式会社同仁化学研究所)

17.1.3.2. アジ化ナトリウム (sodium azide, 化学式: NaN_3)

調製液

5 $\mu\text{g/mL}$ (Lot No.: 100510N)

製造日: 2010 年 5 月 10 日

媒体: 注射用水 (Lot No.: 6H98, 株式会社大塚製薬工場)

原体

Lot No.: M8N8165

製造元: ナカライテスク株式会社

17.1.3.3. 9-アミノアクリジン (9-aminoacridine hydrochloride, 略名: 9AA)

調製液

800 $\mu\text{g/mL}$ (Lot No.: 100511A9)

製造日: 2010 年 5 月 11 日

媒体: DMSO (紫外外部吸収スペクトル用, Lot No.: JK066, 株式会社同仁化学研究所)

原体

Lot No.: M6K8637

製造元: ナカライテスク株式会社

17.1.3.4. 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド [2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 略名: AF-2]

調製液

0.1 $\mu\text{g/mL}$ (Lot No.: 100511AF01), 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (Lot No.: 100511AF10)

製造日: 2010 年 5 月 11 日

媒体: DMSO (紫外外部吸収スペクトル用, Lot No.: JK066, 株式会社同仁化学研究所)

原体

Lot No.: SDJ4376

17.1.4. 陰性対照物質

被験物質の媒体である注射用水を用いた。

17.2. 検体液

17.2.1. 被験物質

17.2.1.1. 調製方法

用量設定試験及び本試験とも，被験物質 500 mg (実秤量値: 用量設定試験; 500.1 mg, 本試験; 500.0 mg) を秤量 (電子天秤: AT261, メトラー・トレド株式会社) した後，注射用水に溶解して，最高濃度 (50 mg/mL) を 10 mL 調製した．最高濃度液以下の濃度液は，50 mg/mL 液の一部を注射用水で段階希釈して，用量設定試験では，15, 5, 1.5, 0.5, 0.15 及び 0.05 mg/mL を，本試験では，25, 12.5, 6.25 及び 3.125 mg/mL を調製した．

17.2.1.2. 被験物質調製液の安定性及び調製頻度

媒体として注射用水を用いた被験物質調製液の安定性については，0.05 及び 200 mg/mL の濃度で調製後，冷蔵 [設定温度: 4°C (実測値: 4.9–6.3°C) ，冷蔵庫: BMS-500F3, 日本フリーザー株式会社]・遮光・気密 7 日間とその後，室温 [設定温度: 23°C (実測値: 23.0–23.3°C)]・遮光・気密で 6 時間まで問題がないことが確認されている¹⁾．

なお，調製は用時に行い，速やかに使用した．

17.2.2. 陽性対照物質

17.2.2.1. 調製方法

試験の際に，ポジコン AM マルチセットを融解して使用した．

以下に各菌株に対する陽性対照物質名，濃度及び試験濃度を示した．

	菌株名	物質名	濃度 (µg/mL)	試験濃度 (µg/plate)
S9 mix (+)	TA100	2AA	10	1
	TA1535	2AA	20	2
	WP2uvrA	2AA	100	10
	TA98	2AA	5	0.5
	TA1537	2AA	20	2
S9 mix (-)	TA100	AF-2	0.1	0.01
	TA1535	NaN ₃	5	0.5
	WP2uvrA	AF-2	0.1	0.01
	TA98	AF-2	1	0.1
	TA1537	9AA	800	80

17.2.3. 残余検体液の取り扱い

残余検体液は，使用後に廃棄した．

17.3. 試験系

17.3.1. 試験菌株

試験菌株は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、*S. typhimurium* の TA100, TA98, TA1535 及び TA1537 並びに *E. coli* の WP2*uvrA* を使用した。TA100 及び TA98 は 1996 年 10 月 18 日に、TA1535, TA1537 及び WP2*uvrA* は 1995 年 2 月 25 日に、いずれも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から入手した。

菌株の特性として「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインとGLP-」²⁾に従い、アミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異*rfa*特性及び薬剤耐性因子R-factorプラスミドの有無を検査し (TA100 及びTA98 の検査日: 2009 年 7 月 28 日-7 月 30 日, TA1535, TA1537 及びWP2*uvrA*の検査日: 2010 年 8 月 25 日-8 月 27 日), 試験施設の基準に適合しているコロニーを選択した (Attachment 1)。

菌株は、特性検査の結果から選択したコロニーを培養し、その菌懸濁液 0.8 mL に対して DMSO を 0.07 mL の割合で加えたものを、チューブ (2 mL 容セラムチューブ, 住友ベークライト株式会社) に 200 μ L ずつ分注し、-80°C 設定の超低温フリーザー (ULT-1386-5A, Kendro Laboratory Products) 内に凍結保管した (TA100 及び TA98 の分注日: 2009 年 8 月 19 日, TA1535, TA1537 及び WP2*uvrA* の分注日: 2010 年 9 月 15 日, 使用期限: 分注後 2 年以内)。菌株の前培養には、ニュートリエントブロス(OXOID NUTRIENT BROTH No.2, Lot No.: 503274, OXOID LTD.) 2.0 g に注射用水 80 mL の割合で加えて高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 分) したニュートリエントブロス培養液を使用した。乾熱滅菌したモルトン栓付の L 字管 (容量: 約 40 mL) にニュートリエントブロス培養液を 10 mL 入れ、分注凍結菌液を融解してその 20 μ L を接種した。これを 37°C 設定の往復振盪型式 (振盪数: 用量設定試験及び本試験とも 90 回/分) の振盪培養器 (MM-10, タイテック株式会社) を用いて、9 時間培養した。

培養終了後、菌懸濁液の濁度を分光光度計 (Novaspec II, GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて測定し、その O.D.値から生菌数を求めた。また、菌懸濁液は使用時まで室温で保管した。用量設定試験及び本試験における各菌株の生菌数を以下に示した。

	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	3.5	4.0	5.2	2.9	1.8
本試験	3.5	3.8	5.1	2.9	1.8

なお、実験操作は空調管理された Ames 試験室 (G 棟) にて行った。

18. S9 mix

S9 (Lot No.: 10081305, オリエンタル酵母工業株式会社) は, フェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンを投与した 7 週齢の雄ラット [CrI:CD (SD)] 37 匹 (体重: 210.1 ± 10.2 g) の肝臓から製造 [製造日: 2010 年 8 月 13 日, 有効期限: 2011 年 2 月 12 日 (当試験施設の基準: 製造後 6 ヶ月)] されたものを使用した. S9 は, 2010 年 9 月 2 日に購入し, -80°C 設定の超低温フリーザー (ULT-1386-5A, Kendro Laboratory Products) 内に凍結保管した.

S9 mix は, S9 mix 用の Cofactor (商品名: Cofactor- I, Lot No.: 999002, オリエンタル酵母工業株式会社) 1 本につき注射用水を 9 mL 加えて溶解した後, メンブランフィルター (φ 0.2 μm, NALGENE®) で濾過し, 使用直前に S9 を 1 mL 加えて調製した. S9 mix の組成を以下に示した.

成分	S9 mix 1 mL中の量	成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 μmol
MgCl ₂	8 μmol	NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-phosphate buffer (pH 7.4)	100 μmol
Glucose-6-phosphate	5 μmol	Distilled water	0.9 mL

19. 培地

最少グルコース寒天平板培地は, テスメディア AN 培地 (Lot No.: ANI410FZ, 製造日: 2010 年 6 月 10 日, オリエンタル酵母工業株式会社) を使用した. テスメディア AN 培地の組成を Attachment 2 に示した.

トッペアガーは, 注射用水に Bacto Agar (Lot No.: 9265367, DIFCO) が 0.6%, 塩化ナトリウムが 0.5%の割合になるように加えて高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分) した. この水溶液に *S. typhimurium* の場合には 0.5 mmol/L L-ヒスチジンと 0.5 mmol/L D-ビオチンを混合した水溶液を, *E. coli* の場合には 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を, それぞれ容量比 10: 1 の割合で加えて調製した.

20. 無菌試験

被験物質の最高濃度液及び S9 mix の無菌試験は, 用量設定試験及び本試験実施の際に, それぞれ 2 枚のプレートを用いて実施した.

試験は, 被験物質の最高濃度液 0.1 mL 又は S9 mix 0.5 mL に, 45°C に保温したトッペアガー 2 mL を加えて最少グルコース寒天平板培地上にまき広げ, プレートを転倒して 37°C 設定の低温恒温器 (IN802, ヤマト科学株式会社) 内で約 48 時間培養した後, コロニーの出現を調べた. 被験物質の最高濃度液の無菌試験には, 用量設定試験及び本試験とも 50 mg/mL 濃度液を用いた.

無菌試験の結果, 用量設定試験及び本試験とも被験物質の最高濃度液及び S9 mix に雑菌の混入は認められなかった.

21. 試験方法

21.1. 試験操作

試験は、プレインキュベーション法により、代謝活性化によらない場合 (S9 mix 無添加) と代謝活性化による場合 (S9 mix 添加) で行った。すなわち、乾熱滅菌した試験管 (15.5×100 mm, 清浄試験管ラルボ, テルモ株式会社) に、① 検体液 0.1 mL, ② 高圧蒸気滅菌した 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (代謝活性化によらない場合) 又は S9 mix 0.5 mL (代謝活性化による場合), ③ 菌懸濁液 0.1 mL の順に加え、往復振盪型式の振盪培養器を用いて 37°C で 20 分間インキュベーションした。その後、45°C に保温したトップアガーを 2 mL 加えて混合した後、最少グルコース寒天平板培地上にまき広げ、プレートを転倒して 37°C 設定の低温恒温器内で約 48 時間培養した。

培養終了後、プレート上での析出物の有無を肉眼で観察した後、復帰変異コロニー数を、コロニーアナライザー (CA-11D, システムサイエンス株式会社) により計測した。計測後、菌の生育阻害の有無を 100 倍の実体顕微鏡下で観察した。なお、プレート上での析出物の有無は、培養開始時にも肉眼で観察した。

プレートは、菌株、代謝活性化の有無及び濃度の組み合わせごとに 3 枚を使用した。また、試験管及びプレートは、菌株ごとに油性インクで色分けすることで識別した。

21.2. 用量設定試験

用量設定試験の試験濃度は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づき、S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、いずれの菌株も 5000 µg/plate を最高濃度として、以下 1500, 500, 150, 50, 15 及び 5 µg/plate の計 7 濃度を設定した。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

21.3. 本試験

用量設定試験の結果、S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、すべての菌株において、菌の生育阻害及び復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、用量設定試験と同様に 5000 µg/plate を最高濃度として、以下公比 2 で 5 濃度を設定した。すなわち、S9 mix 無添加及び S9 mix 添加のいずれの菌株も 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate とした。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

22. 試験の成立条件

無菌試験で被験物質の最高濃度液及び S9 mix に雑菌の混入がなく、復帰変異コロニー数が陰性対照では試験施設のバックグラウンドデータ (Attachment 3) の平均±2 S.D.の範囲内にあり、陽性対照では陰性対照の 2 倍以上に増加し、また、用量設定試験と本試験との間に再現性が認められ、さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験成立とした。

23. 統計学的方法

復帰変異コロニー数は、濃度ごとに平均値及び標準偏差を算出した。なお、下記の判定基準に従ったため、有意差検定は実施しなかった。

24. 判定基準

試験の結果は、被験物質を処理したプレートにおける復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上の値を示し、更に濃度に依存して増加した場合を陽性とした。

25. 試験結果

25.1. 用量設定試験 (Table1-1, 1-2 及び Figure 2-1, 2-2)

25.1.1. プレート上の析出物

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、培養開始時及び培養終了時の析出物は認められなかった。

25.1.2. 菌の生育阻害

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。

25.1.3. 復帰変異コロニー数

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性対照の 2 倍未満であった。

25.1.4. 対照物質

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均 \pm 2 S.D.の範囲内であった。

25.2. 本試験 (Table2-1, 2-2 及び Figure 3-1, 3-2)

25.2.1. プレート上の析出物

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、培養開始時及び培養終了時の析出物は認められなかった。

25.2.2. 菌の生育阻害

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。

25.2.3. 復帰変異コロニー数

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性対照の 2 倍未満であった。

25.2.4. 対照物質

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均 \pm 2 S.D.の範囲内であった。

26. 考 察

4-メチルピリジンの遺伝子突然変異誘発性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した。

4-メチルピリジンは、S9 mix 無添加及びS9 mix 添加とも、いずれの菌株のすべての濃度において、復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以上に増加しなかった。

無菌試験では、被験物質の最高濃度液及びS9 mix に雑菌の混入は認められなかった。

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均 \pm 2 S.D.の範囲内であった。

用量設定試験及び本試験には再現性が認められた。

以上の結果、当試験の条件下において、4-メチルピリジンに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。

27. 文 献

- 1) 4-メチルピリジンの注射用水中での安定性確認試験 (試験番号: 092430), 株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所; 2010.
- 2) 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, 平成3年3月

Table 1-1. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	0	125	11	27	30	14
			139	11	31	31	22
			151 (138 \pm 13.0)	12 (11 \pm 0.6)	37 (32 \pm 5.0)	32 (31 \pm 1.0)	22 (19 \pm 4.6)
	4-methylpyridine	5	99	11	21	38	11
			114	11	28	39	17
			137 (117 \pm 19.1)	12 (11 \pm 0.6)	35 (28 \pm 7.0)	40 (39 \pm 1.0)	22 (17 \pm 5.5)
		15	124	9	31	24	13
			135	11	32	26	24
			169 (143 \pm 23.5)	13 (11 \pm 2.0)	37 (33 \pm 3.2)	36 (29 \pm 6.4)	27 (21 \pm 7.4)
		50	103	5	24	20	10
			148	6	25	24	15
	164 (138 \pm 31.6)		7 (6 \pm 1.0)	31 (27 \pm 3.8)	25 (23 \pm 2.6)	19 (15 \pm 4.5)	
	150	151	6	18	19	11	
		162	10	23	23	18	
188 (167 \pm 19.0)		14 (10 \pm 4.0)	26 (22 \pm 4.0)	27 (23 \pm 4.0)	19 (16 \pm 4.4)		
500	129	9	20	25	12		
	143	12	29	26	15		
	166 (146 \pm 18.7)	13 (11 \pm 2.1)	35 (28 \pm 7.5)	30 (27 \pm 2.6)	21 (16 \pm 4.6)		
1500	130	9	28	23	13		
	138	10	32	28	17		
	156 (141 \pm 13.3)	12 (10 \pm 1.5)	37 (32 \pm 4.5)	28 (26 \pm 2.9)	23 (18 \pm 5.0)		
5000	113	9	23	25	24		
	131	14	24	28	24		
	132 (125 \pm 10.7)	17 (13 \pm 4.0)	26 (24 \pm 1.5)	29 (27 \pm 2.1)	27 (25 \pm 1.7)		
Positive control	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA	
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of revertant colonies/plate	465 486 576 (509 \pm 59.0)	486 522 543 (517 \pm 28.8)	98 104 108 (103 \pm 5.0)	420 469 505 (465 \pm 42.7)	429 456 539 (475 \pm 57.3)	

Negative control : Distilled water.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃ : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

(): Mean \pm S.D.

No growth inhibition of tester strains was observed.

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate at the start and on completion of incubation.

Table 1-2. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	0	136	13	32	32	18
			138	13	34	38	22
			160 (145 \pm 13.3)	19 (15 \pm 3.5)	34 (33 \pm 1.2)	39 (36 \pm 3.8)	26 (22 \pm 4.0)
	4-methylpyridine	5	143	8	33	19	15
			147	9	43	31	17
			157 (149 \pm 7.2)	10 (9 \pm 1.0)	43 (40 \pm 5.8)	36 (29 \pm 8.7)	23 (18 \pm 4.2)
		15	133	7	27	35	17
			135	8	34	39	20
			155 (141 \pm 12.2)	18 (11 \pm 6.1)	34 (32 \pm 4.0)	40 (38 \pm 2.6)	25 (21 \pm 4.0)
		50	134	10	21	20	19
			140	16	35	26	23
		140 (138 \pm 3.5)	17 (14 \pm 3.8)	35 (30 \pm 8.1)	49 (32 \pm 15.3)	27 (23 \pm 4.0)	
	150	145	6	31	26	19	
		149	7	40	36	20	
		205 (166 \pm 33.5)	12 (8 \pm 3.2)	48 (40 \pm 8.5)	39 (34 \pm 6.8)	22 (20 \pm 1.5)	
500	151	6	28	30	15		
	157	9	36	31	17		
	157 (155 \pm 3.5)	12 (9 \pm 3.0)	40 (35 \pm 6.1)	32 (31 \pm 1.0)	21 (18 \pm 3.1)		
1500	130	7	27	35	18		
	143	9	30	37	19		
	153 (142 \pm 11.5)	11 (9 \pm 2.0)	36 (31 \pm 4.6)	37 (36 \pm 1.2)	22 (20 \pm 2.1)		
5000	130	11	23	20	18		
	139	15	36	30	18		
	158 (142 \pm 14.3)	15 (14 \pm 2.3)	36 (32 \pm 7.5)	33 (28 \pm 6.8)	24 (20 \pm 3.5)		
Positive control	Name	2AA					
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
	Number of revertant colonies/plate	893 934 963 (930 \pm 35.2)	291 330 346 (322 \pm 28.3)	895 900 995 (930 \pm 56.3)	322 358 373 (351 \pm 26.2)	210 241 245 (232 \pm 19.2)	

Negative control : Distilled water.

2AA : 2-Aminoanthracene.

(): Mean \pm S.D.

No growth inhibition of tester strains was observed.

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate at the start and on completion of incubation.

Table 2-1. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria (mutagenicity test)

S9 mix		Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	0	126	10	28	23	6
			132	11	31	30	10
			148 (135 \pm 11.4)	12 (11 \pm 1.0)	31 (30 \pm 1.7)	32 (28 \pm 4.7)	14 (10 \pm 4.0)
	4-methylpyridine	312.5	153	6	17	29	5
			165	7	23	35	9
			168 (162 \pm 7.9)	11 (8 \pm 2.6)	32 (24 \pm 7.5)	35 (33 \pm 3.5)	12 (9 \pm 3.5)
		625	145	9	18	25	11
			153	11	23	30	12
			173 (157 \pm 14.4)	12 (11 \pm 1.5)	27 (23 \pm 4.5)	40 (32 \pm 7.6)	13 (12 \pm 1.0)
	1250	122	6	15	25	9	
		137	8	29	38	10	
		139 (133 \pm 9.3)	14 (9 \pm 4.2)	30 (25 \pm 8.4)	41 (35 \pm 8.5)	10 (10 \pm 0.6)	
	2500	133	3	19	30	8	
146		8	22	37	9		
150 (143 \pm 8.9)		9 (7 \pm 3.2)	30 (24 \pm 5.7)	39 (35 \pm 4.7)	11 (9 \pm 1.5)		
5000	114	7	14	28	7		
	120	9	19	29	10		
	133 (122 \pm 9.7)	15 (10 \pm 4.2)	20 (18 \pm 3.2)	44 (34 \pm 9.0)	11 (9 \pm 2.1)		
Positive control	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA	
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of revertant colonies/plate	426 472 483 (460 \pm 30.2)	454 472 502 (476 \pm 24.2)	104 108 132 (115 \pm 15.1)	418 446 456 (440 \pm 19.7)	254 309 396 (320 \pm 71.6)	

Negative control : Distilled water.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃ : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

(): Mean \pm S.D.

No growth inhibition of tester strains was observed.

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate at the start and on completion of incubation.

Table 2-2. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria (mutagenicity test)

S9 mix		Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	0	137	8	19	35	12
			147	13	30	39	19
			160 (148 \pm 11.5)	14 (12 \pm 3.2)	30 (26 \pm 6.4)	44 (39 \pm 4.5)	21 (17 \pm 4.7)
	4-methylpyridine	312.5	135	7	27	34	12
			148	9	31	37	17
			164 (149 \pm 14.5)	13 (10 \pm 3.1)	39 (32 \pm 6.1)	44 (38 \pm 5.1)	17 (15 \pm 2.9)
		625	143	5	20	26	14
			144	7	23	37	20
			168 (152 \pm 14.2)	9 (7 \pm 2.0)	38 (27 \pm 9.6)	43 (35 \pm 8.6)	21 (18 \pm 3.8)
	1250	135	10	30	31	15	
		138	12	32	35	16	
		150 (141 \pm 7.9)	14 (12 \pm 2.0)	35 (32 \pm 2.5)	36 (34 \pm 2.6)	20 (17 \pm 2.6)	
	2500	119	5	19	31	7	
		133	6	24	31	11	
146 (133 \pm 13.5)		10 (7 \pm 2.6)	31 (25 \pm 6.0)	34 (32 \pm 1.7)	11 (10 \pm 2.3)		
5000	110	10	19	21	9		
	118	12	19	21	10		
	136 (121 \pm 13.3)	15 (12 \pm 2.5)	27 (22 \pm 4.6)	26 (23 \pm 2.9)	14 (11 \pm 2.6)		
Positive control	Name	2AA					
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
	Number of revertant colonies/plate	752 830 899 (827 \pm 73.5)	248 279 287 (271 \pm 20.6)	782 856 860 (833 \pm 43.9)	318 324 339 (327 \pm 10.8)	168 203 212 (194 \pm 23.2)	

Negative control : Distilled water.

2AA : 2-Aminoanthracene.

(): Mean \pm S.D.

No growth inhibition of tester strains was observed.

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate at the start and on completion of incubation.

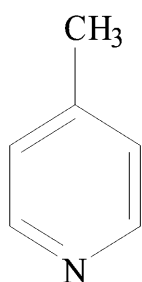


Figure 1. Chemical structure of 4-methylpyridine.

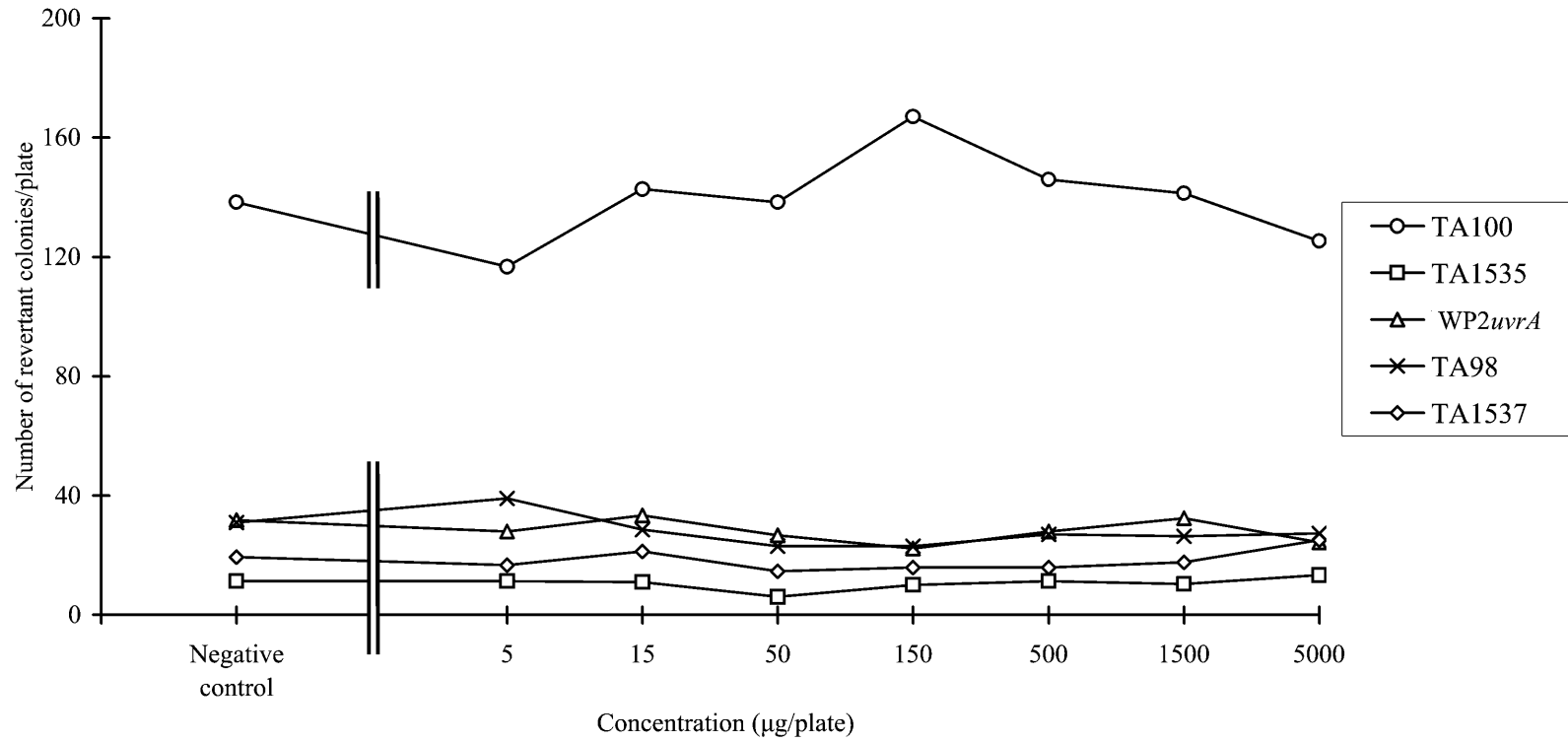


Figure 2-1. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria.
(dose- finding test: without S9 mix)

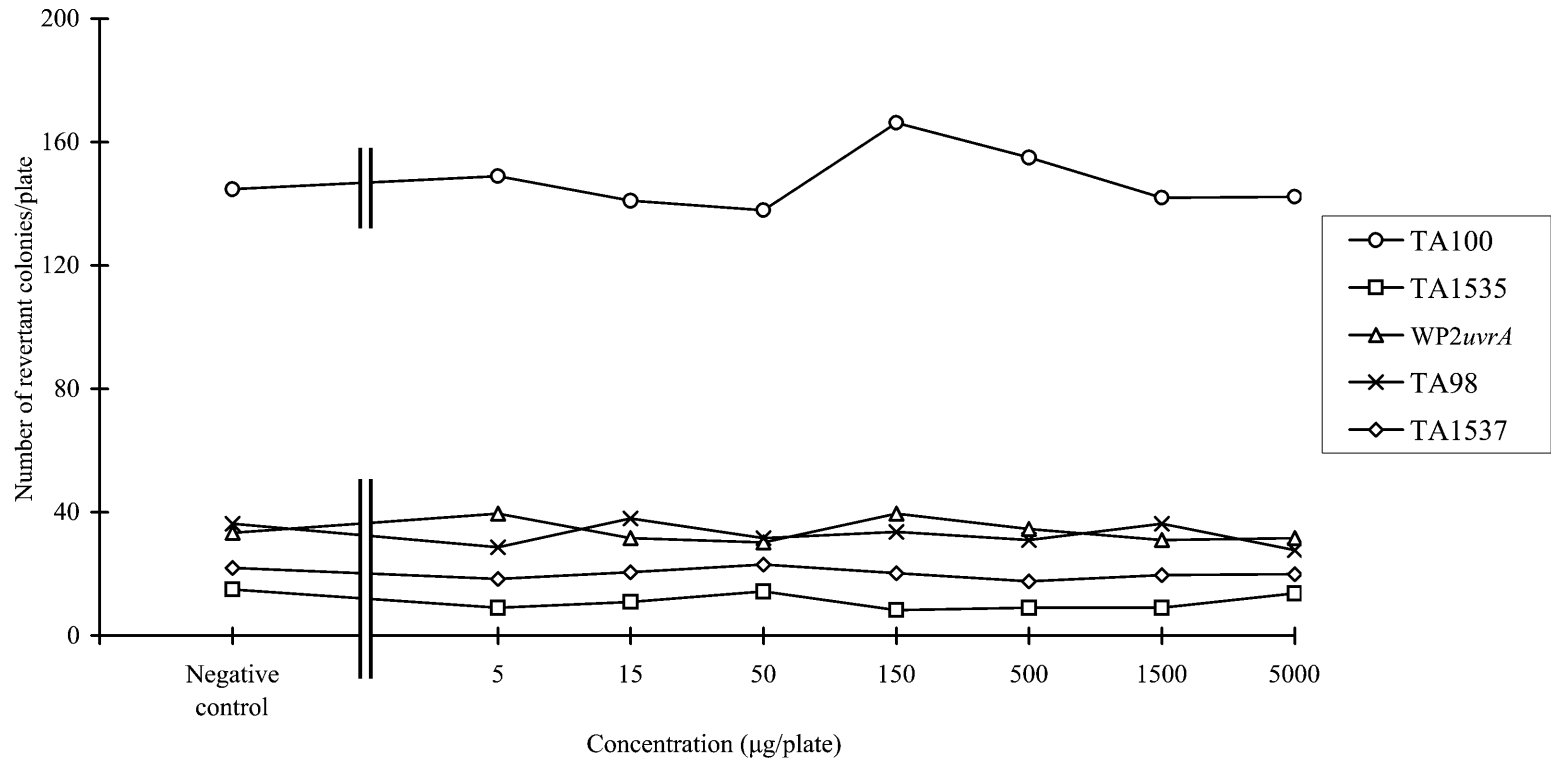


Figure 2-2. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria.
(dose- finding test: with S9 mix)

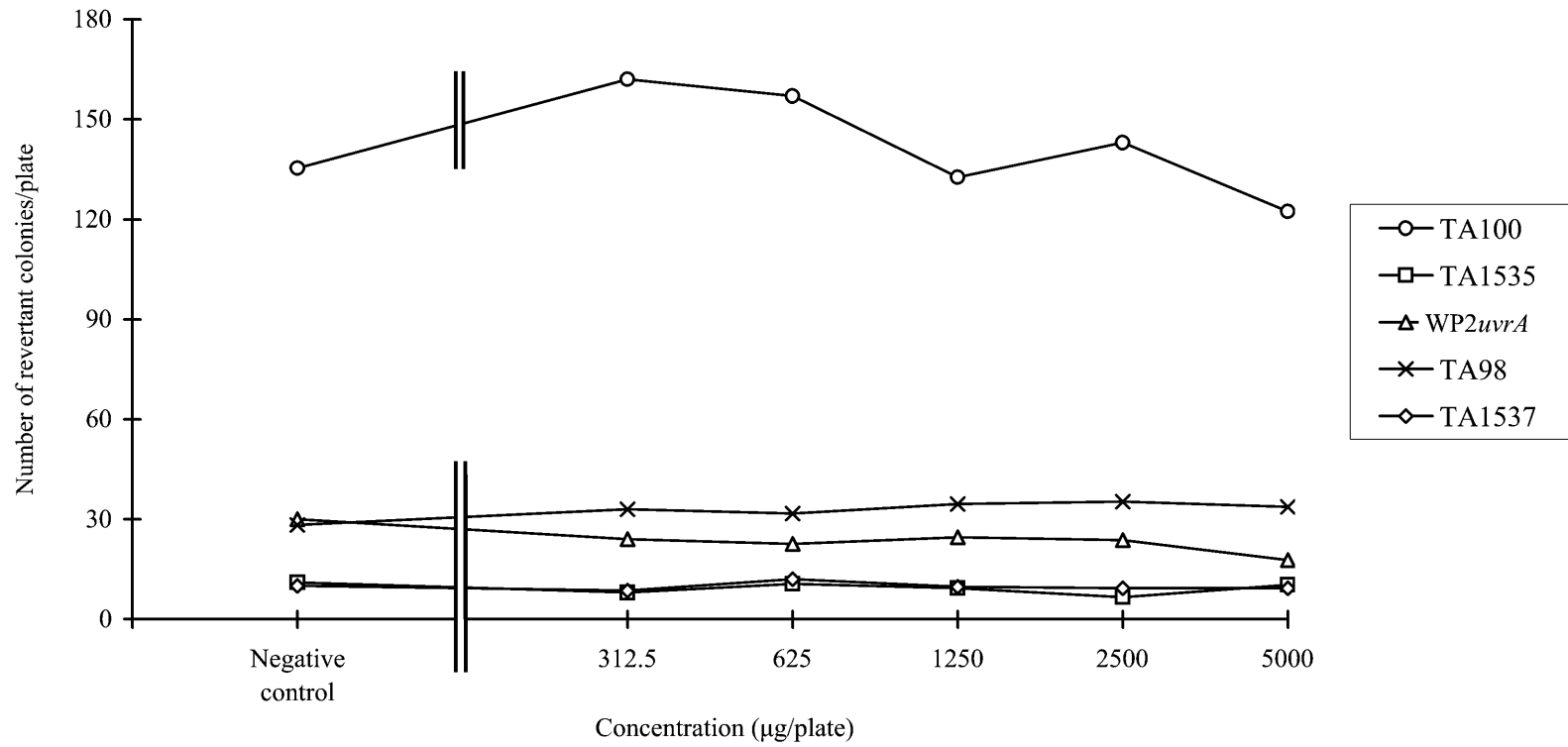


Figure 3-1. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria.
(mutagenicity test: without S9 mix)

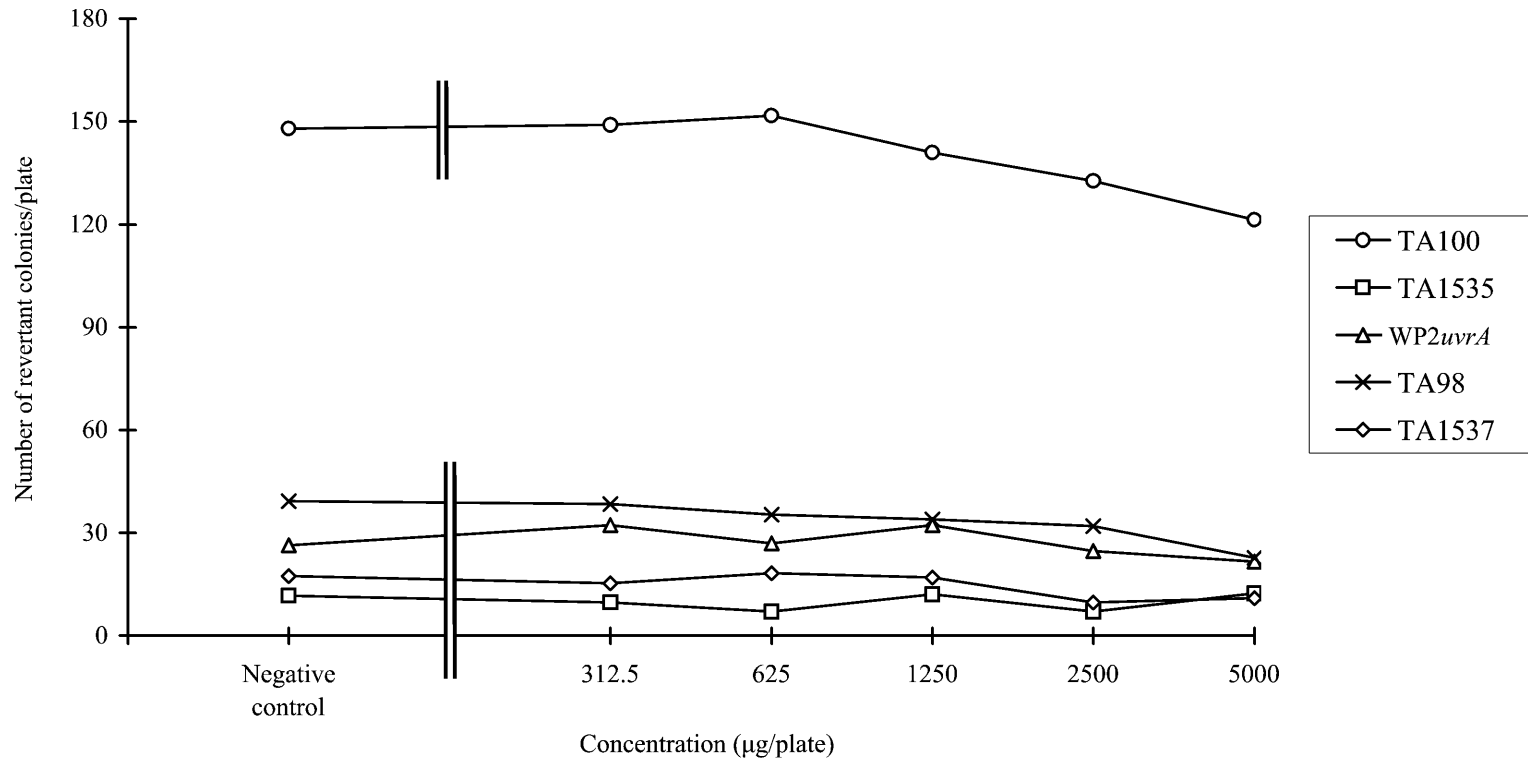


Figure 3-2. Reverse mutation test of 4-methylpyridine with bacteria.
(mutagenicity test: with S9 mix)