BOZO RESEARCH CENTER INC.

最終報告書

シクロヘキセンの細菌を用いた復帰突然変異試験

M-1056

株式会社ボゾリサーチセンター

東京本部 〒151-0065 東京都渋谷区大山町36－7
本社・東京研究所 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木1－3－11
御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所 〒419-0101 静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目　次

頁

目　次 …… 1

要　約 …… 5

緒　言 …… 6

試験材料及び方法

1.　被験物質及び対照物質 …… 7

1-1. 被験物質及び媒体 …… 7

1-2. 被験液の調製 …… 8

1-3. 対照物質 …… 8

2.　使用菌株 …… 10

3.　試　　薬 …… 11

4.　試験方法 …… 13

4-1. 識別方法 …… 13

4-2. 前培養条件 …… 13

4-3. 濃度設定試験 …… 14

4-4. 本試験 …… 14

4-5. 追加確認試験 …… 15

5.　判定基準 …… 15

6.　統計解析 …… 15

試験結果 …… 16

考　察 …… 18

頁

参考文献 ····· 19

Tables and Figures

Table 1 Results of Dose Range Finding Test without Metabolic Activation ····· 27

Table 2 Results of Dose Range Finding Test with Metabolic Activation ····· 28

Table 3 Results of Main Test without Metabolic Activation ····· 29

Table 4 Results of Main Test with Metabolic Activation ····· 30

Figure 1 Concentrations and Number of Revertant Colonies in *Salmonella typhimurium* TA100 ····· 31

Figure 2 Concentrations and Number of Revertant Colonies in *Salmonella typhimurium* TA98 ····· 32

Figure 3 Concentrations and Number of Revertant Colonies in *Salmonella typhimurium* TA1535 ····· 33

Figure 4 Concentrations and Number of Revertant Colonies in *Salmonella typhimurium* TA1537 ····· 34

Figure 5 Concentrations and Number of Revertant Colonies in *Escherichia coli* WP2 *uvrA* ····· 35

要　約

ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* TA100、TA98、TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いて、シクロヘキセンにおける突然変異誘発能の有無を検討した。

1. 沈殿/結晶

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの濃度においても沈殿/結晶の析出は認められなかった。

2. 生育阻害

Escherichia coli WP2 *uvrA* の非代謝活性化においては濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても試験菌株に対する生育阻害は認められなかったが、*Salmonella typhimurium* TA100、TA98、TA1535 及び TA1537 においては代謝活性化の有無にかかわらず 625 μg/palte 以上、*Escherichia coli* WP2 *uvrA* の代謝活性化においては 1250 μg/plate 以上の被験物質処理群において試験菌株に対する生育阻害が認められた。

3. 復帰変異コロニー

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、溶媒対照と比較して 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。

以上の結果より、本試験条件下においてシクロヘキセンの復帰突然変異誘発能は陰性と判定した。

緒　言

厚生省生活衛生局の依頼により、シクロヘキセンの細菌を用いる復帰突然変異試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準及びガイドラインに準拠して実施した。

- 「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」
  (昭和59年3月31日；環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号連名基準)
  一部改正（昭和63年11月18日；環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）
- 「『新規化学物質等に係る試験の方法について』の一部改正等について」
  (平成9年10月31日；環保安第287号環境庁企画調整局長、衛生第127号厚生省生活衛生局長、平成09･10･31基局第2号通商産業省基礎産業局長連名通知)
- "OECD Principles of Good Laboratory Practice" (as revised in 1997)
- "OECD Guidelines for Testing of Chemicals Section 4" (1997)

試験材料及び方法

1. 被験物質及び対照物質

1－1. 被験物質及び媒体

1-1-1. 被験物質

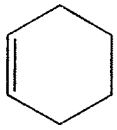
供　給　者　：　厚生省生活衛生局企画課　生活化学安全対策室

製　造　者　：

名　　称　：　シクロヘキセン

CAS番号　：　110-83-8

構　造　式　：



ロット番号　：

純　　度　：　98.63%

ベンゼン：0.799%、シクロヘキサン：0.526%、水分：0.003%

BHT(2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol)：0.01%(酸化防止剤)

性　　状　：　液体

比　　重　：　0.811（20℃）

分 子 量　：　82.14

安 定 性　：　常温、常圧で安定

保存方法　：　冷暗所、密閉

保存場所　：　株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所被験物質保存室及び変異原性試験室

返　　却　：　被験物質の残量はすべて試験委託者に返却した。

1-1-2. 媒体

名　　称　：　エタノール

ロット番号　：　V7R1553

製 造 元　：　ナカライテスク

保存方法　：　室温

保存場所　：　株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

1-2. 被験液の調製

調製方法　：　濃度設定試験は、無菌的操作によりシクロヘキセンを採取し、50mg/mL(最少グルコース寒天平板培地シャーレに添加した際の最終濃度：5000μg/plate)を最高用量としてエタノールにより溶解し、以下公比4で7段階希釈した計8濃度(①0.00305、②0.0122、③0.0488、④0.195、⑤0.781、⑥3.13、⑦12.5及び⑧50.0mg/mL)を設定した。

本試験は、50.0mg/mL(適用濃度：5000μg/plate)を最高用量として、以下公比2で8段階希釈した計9濃度（①0.195、②0.391、③0.781、④1.56、⑤3.13、⑥6.25、⑦12.5、⑧25.0及び⑨50.0mg/mL）を設定した。

なお、シクロヘキセンの秤取量は比重により換算し、濃度の記載について純度換算は行わなかった。

保存方法　：　被験液は用時調製とし保存しなかった。

安定性　：　シクロヘキセンにエタノールを添加した際の発泡、発熱、吸熱、着色は観察されず、媒体中の急速な分解は示唆されなかった。

1-3. 対照物質

1)　溶媒対照（陰性対照）

名称　：　エタノール

ロット番号　：　V7R1553

製造元　：　ナカライテスク

保存方法　：　室温

保存場所　：　株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

2)　陽性対照

名称　：　AF-2 (2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide)

ロット番号　：　PAN0050

製造元　：　和光純薬工業株式会社

保存方法　：　室温、遮光

名　　称　：　SAZ (Sodium azide)
ロット番号　：　TPG6789
製 造 元　：　和光純薬工業株式会社
保存方法　：　室温、遮光

名　　称　：　ICR-191 (2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino] acridine・2HCl)
ロット番号　：　465901
製 造 元　：　Polysciences,Inc.
保存方法　：　冷蔵

名　　称　：　2AA (2-aminoanthracene)
ロット番号　：　M7K7000
製 造 元　：　ナカライテスク
保存方法　：　冷蔵

名　　称　：　B[a]P (Benzo[a]pyrene)
ロット番号　：　M5K8326
製 造 元　：　ナカライテスク
保存方法　：　室温、遮光

保存場所　：　株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

(1) 調製方法

次の処理濃度となるように、AF-2、ICR-191、2AA、B[a]P は DMSO（和光純薬工業株式会社、試薬特級、Lot No.：KSF7943）、SAZ は、注射用水（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、Lot No.：8I79N）により溶解し、目的濃度に調製した。

対象菌株	陽性対照物質（処理量μg/plate）	
	非代謝活性化（－S9）	代謝活性化（＋S9）
Salmonella typhimurium TA100	AF-2（0.01）	B[a]P（5.0）
Salmonella typhimurium TA98	AF-2（0.1）	B[a]P（5.0）
Salmonella typhimurium TA1535	SAZ（0.5）	2AA（2.0）
Salmonella typhimurium TA1537	ICR-191（1.0）	B[a]P（5.0）
Escherichia coli WP2 *uvrA*	AF-2（0.01）	2AA（10.0）

(2) 陽性対照物質の選択理由

遺伝毒性試験のガイドラインに準じて選択した。

2. 使用菌株

1) 供試菌株

次の５種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

Salmonella typhimurium TA100

Salmonella typhimurium TA1535

Escherichia coli WP2 *uvr*A

フレームシフト型

Salmonella typhimurium TA98

Salmonella typhimurium TA1537

2) 入手先及び入手年月日

Salmonella typhimurium TA100 ： 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
1997年10月9日 入手

Salmonella typhimurium TA98 ： 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
1997年10月9日 入手

Salmonella typhimurium TA1535 ： 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
1997年10月9日 入手

Salmonella typhimurium TA1537 ： 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
1997年10月9日 入手

Escherichia coli WP2 *uvr*A ： 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
1997年10月9日 入手

3) 菌株の選択理由

遺伝毒性試験のガイドラインに準じて選択した。当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている。

4) 菌株の保存

菌懸濁液 0.8mL に対して DMSO 0.07mL の割合で加え、分注後－80℃で保存した。

3. 試　薬

1) S9

名　　称　：　S9 (Cofactor A set)
ロット番号　：　99121609
製 造 元　：　オリエンタル酵母工業株式会社
製 造 日　：　1999 年 12 月 16 日
購 入 日　：　2000 年　2 月　2 日
種・系統　：　ラット・SD 系
　性　　：　雄
週　　齢　：　7 週齢
体　　重　：　202.4±8.2 g
誘導物質　：　フェノバルビタール（PB）&5,6-ベンゾフラボン（BF）
投 与 法　：　腹腔内投与
投与期間及び投与量
　　：　PB　4 日間　30＋60＋60＋60mg/kg body weight
　　BF　1 日間　80mg/kg body weight
保存方法　：　冷凍保存（約－80℃）
保存場所　：　株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

2) Cofactor

名　　称　：　Cofactor　(Cofactor A set)
ロット番号　：　A99121307
製 造 元　：　オリエンタル酵母工業株式会社
保存方法　：　冷凍保存（約－80℃）
保存場所　：　株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

3) S9 mix の組成

S9	1 mL		
Cofactor	9 mL	0.4M 塩化マグネシウム水溶液	0.2 mL
		1.65M 塩化カリウム水溶液	0.2 mL
		1.0M グルコース-6-リン酸水溶液	0.05 mL
		0.1M 還元型ニコチンアミド-アデニン ジヌクレオチドリン酸(NADPH)水溶液	0.4 mL
		0.1M 還元型ニコチンアミド-アデニン ジヌクレオチド(NADH)水溶液	0.4 mL
		0.2M ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	5.0 mL
		精製水	2.75 mL

4) トップアガー

名　　称 : BACTO-AGAR
ロット番号 : 108481JA
製 造 元 : DIFCO LABORATORIES
保存方法 : 室温
保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

5) 最少グルコース寒天平板培地

名　　称 : 最少グルコース寒天培地 BZ
ロット番号 : BZ010BP
製 造 元 : オリエンタル酵母工業株式会社
保存方法 : 15～25℃
保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

4. 試験方法[1-5)]

4－1. 識別方法

1) 菌株の識別

Salmonella typhimurium TA100	青
Salmonella typhimurium TA98	緑
Salmonella typhimurium TA1535	桃
Salmonella typhimurium TA1537	赤
Escherichia coli WP2 *uvr*A	黄

2) 濃度の識別

溶媒対照を「SC」(Solvent Control)、陽性対照を「PC」(Positive Control)とし、被験物質処理群の濃度の低い方から「1」「2」「3」「4」「5」「6」･･･と番号をつけた。なお、非代謝活性化は「－」、代謝活性化は「＋」をそれぞれ番号の前につけた。

4－2. 前培養条件

1) ニュートリエントブロス

名　　称　：　Nutrient Broth No.2
ロット番号　：　59365
製 造 元　：　OXOID
保存方法　：　室温
保存場所　：　株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

2) 振盪培養装置

型　　式　：　BIOSPIN MBS-1
製 造 元　：　東京理化器械株式会社(EYELA)

3) 前培養方法

無菌的操作により培養用三角フラスコにニュートリエントブロス 30mL を分注し、以下に示す凍結保存菌懸濁液を接種した。

Salmonella typhimurium TA 株：　60μL
Escherichia coli 株：　30μL

これを37℃で約8時間前培養した後に吸光度を測定し、この吸光度から換算した理論生菌数が1×10⁹個/mL以上の菌濃度であることを確認し供試菌懸濁液とした。

前培養終了後に測定したO.D.値より換算した生菌数

菌株	濃度設定試験	本試験
Salmonella typhimurium TA100	1.37×10^9/mL	1.55×10^9/mL
Salmonella typhimurium TA98	1.77×10^9/mL	2.26×10^9/mL
Salmonella typhimurium TA1535	2.01×10^9/mL	2.18×10^9/mL
Salmonella typhimurium TA1537	1.70×10^9/mL	2.23×10^9/mL
Escherichia coli WP2 *uvrA*	3.37×10^9/mL	3.76×10^9/mL

4－3. 濃度設定試験

被験物質の5000μg/plateを最高用量とし、以下公比4で希釈した計8濃度の濃度設定試験を実施した。

操作は、被験液0.1mLに非代謝活性化においては0.1Mナトリウム－リン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5mL、代謝活性化においてはS9 mix 0.5mLを加え、更に各菌懸濁液0.1mLを加えた。37℃で20分間振盪し(プレインキュベーション)、これにトップアガーを2.0mL加えた後に最少グルコース寒天平板培地に重層した。37℃で48時間培養した後、試験菌株の生育阻害及び沈殿/結晶の析出の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。この結果、菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、全被験物質処理群において沈殿/結晶の析出が認められなかったため、出現した復帰変異コロニーをコロニーカウンター（バイオマルチスキャナーBMS-400、東洋測器）を用いて計数した。

なお、トップアガーは、*Salmonella typhimurium* TA株を用いる場合は0.5mM D-ビオチン－0.5mM ヒスチジン溶液を1/10容、また *Escherichia coli* 株を用いる場合には0.5mM L-トリプトファン溶液を同割合で軟寒天液(0.6%Agar、0.6%NaCl)に加えたものを用いた。また、最少グルコース寒天平板培地は各用量につき3 plate設けた。

4－4. 本試験

濃度設定試験の結果、試験菌株に対する生育阻害が認められたため、各菌株の生育阻害の認められた用量を最高用量とし、以下公比2で6段階希釈した計7濃度の用量につい

て本試験を実施した。なお、試験操作は濃度設定試験と同条件とし、濃度設定試験結果と本試験結果の判定の再現性を確認した。

4-5. 追加確認試験

追加確認試験の必要性が認められなかったため実施しなかった。

5. 判定基準

結果の判定は、被験物質処理における復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数に対して顕著に増加し（溶媒対照の２倍を目安とした）、この増加に用量反応性が認められ、また濃度設定試験・本試験の各判定に再現性が認められた場合に陽性と判定した。なお、判定に際しては統計学的処理は行わなかった。

6. 統計解析

統計解析は実施しなかった。

試験結果

1. 濃度設定試験

濃度設定試験の結果を Table 1, 2 及び Figure 1～5（上段）に示した。

1) 培養終了前後の観察結果

重層処理直後の肉眼による観察及び培養終了後の肉眼と実体微鏡による観察のいずれにおいても、菌株及び代謝活性化の有無に関わらずシクロヘキセンを処理した全ての寒天培地シャーレにおいて、結晶/沈殿の析出は認められなかった。また、培養終了後の観察において、*Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株の非代謝活性化を除く全ての菌株の 1250 μg/plate 以上の被験物質処理群において、菌株に対する生育阻害が観察された。

2) 復帰変異コロニー数

シクロヘキセンを処理した全用量群について、溶媒対照と比較して 2 倍以上及び用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

3) 試験系の成立条件

陽性対照群では各菌株の溶媒対照に比較して 2 倍以上の復帰変異コロニーが認められた。

全ての用量群について 3 枚のシャーレによる復帰変異コロニー数に顕著な差は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかった。

各菌株の代謝活性化の存在下及び非存在下における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は試験実施施設における背景データ（Attached Data 4)との比較において異常と考えられる数値を認めなかった。

2. 本試験

本試験の結果を Table 3,4 及び Figure 1～5（下段）に示した。

1) 濃度設定理由

濃度設定試験の結果、試験菌株に対する生育阻害が認められたため、各菌株の生育阻害の認められた用量、すなわち、*Salmonella typhimurium* TA100、TA98、TA1535、

TA1537 の代謝活性化及び非代謝活性化、*Escherichia coli* WP2 *uvrA* の代謝活性化においては 1250 μg/plate、*Escherichia coli* WP2 *uvrA* の非代謝活性化においては 5000 μg/plate を最高用量とし、以下公比 2 で 6 段階希釈した計 7 濃度の用量を設定した。

2) 培養終了前後の観察結果

重層処理直後の肉眼による観察及び培養終了後の肉眼と実体微鏡による観察のいずれにおいても、菌株及び代謝活性化の有無に関わらず、シクロヘキセンを処理した全ての寒天培地シャーレにおいて、結晶/沈殿の析出は認められなかった。また、培養終了後の観察において、*Salmonella typhimurium* TA100、 TA98、 TA1535、TA1537 の代謝活性化及び非代謝活性化においては 625 及び 1250 μg/plate、*Escherichia coli* WP2 *uvrA* の代謝活性化においては 1250 μg/plate の被験物質処理群に菌の生育阻害が観察された。

3) 復帰変異コロニー数

シクロヘキセンを処理した全用量群について、溶媒対照と比較して 2 倍以上及び用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

4) 試験系の成立条件

陽性対照群では各菌株の溶媒対照に比較して 2 倍以上の復帰変異コロニーが認められた。

全ての用量群について 3 枚のシャーレによる復帰変異コロニー数に顕著な差は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかった。

各菌株の代謝活性化の存在下及び非存在下における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は試験実施施設における背景データ(Attached Data 4)との比較において異常と考えられる数値を認めなかった。

考　察

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、菌株、被験物質濃度及び代謝活性化の有無にかかわらず、溶媒対照と比較して2倍以上及び用量依存的な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、本被験物質の復帰突然変異誘発能は陰性であることが示唆された。一方、陽性対照群では各菌株の溶媒対照群に比較して2倍以上の復帰変異コロニーが認められたことから、供試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た。
更に、各菌株の代謝活性化及び非代謝活性化における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は試験実施施設における背景データとの比較において異常と考えられる数値を認めず、試験は適切に実施されたものと考えた。

以上の結果より、シクロヘキセンは本試験条件下において復帰突然変異誘発能を有さないと判断した。

参考文献

1) Bruce N.Ames, Joyce McCann and Edith Yamasaki.: Methods for detecting carcino-gens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research. 31.347-364.1975

2) Dorothy M.Maron and Bruce N.Ames.: Revised methods for the Salmonella muta-genicity test. Mutation Research. 113.173-215.1983

3) 石館基監修、能美健彦、松井道子編集: 微生物を用いる変異原性試験データ集、株式会社エル・アイ・シー、1991

4) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集: 厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験Q&A、サイエンティスト社、1992

5) 日本バイオアッセイ研究センター編集：微生物を用いる変異原性試験手法解説、富士オフセット株式会社、1999

Table 1 Results of Dose Range Finding Test without Metabolic Activation

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertant (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (−)	Solvent control	108 108 (110) 114	13 15 (15) 17	29 28 (27) 24	21 24 (24) 27	12 12 (11) 9
	0.305	116 101 (109) 109	15 19 (15) 11	31 32 (29) 25	21 21 (23) 27	11 13 (12) 11
	1.22	108 109 (107) 104	16 12 (14) 13	28 23 (26) 28	20 20 (21) 24	15 13 (14) 13
	4.88	106 102 (112) 128	9 12 (11) 13	29 36 (32) 32	25 25 (23) 20	16 12 (14) 13
	19.5	100 121 (112) 114	15 17 (14) 11	29 23 (28) 32	27 24 (26) 27	11 15 (12) 11
	78.1	104 102 (103) 102	11 11 (12) 13	23 24 (25) 28	28 24 (24) 20	17 12 (15) 15
	313	100 110 (103) 100	17 12 (14) 12	31 29 (29) 27	23 23 (22) 19	15 12 (13) 12
	1250	97 b 90 b (100) 114 b	7 b 8 b (7) 7 b	31 24 (28) 28	16 b 16 b (16) 16 b	7 b 8 b (7) 7 b
	5000	0 b 0 b (0) 0 b	4 b 4 b (4) 4 b	29 23 (27) 29	9 b 8 b (8) 8 b	5 b 1 b (3) 3 b
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2#1	SAZ#2	AF-2	AF-2	ICR-191#3
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of colonies/plate	843 821 (871) 948	313 302 (307) 305	141 152 (152) 164	399 403 (402) 404	1682 1760 (1791) 1932

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide、#2: Sodium azide、
#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine.2HCl
( ) :Mean of 3 plates. Rounded to the nearest whole number.
Deposition of crystals was not seen at any dose levels.
b: Growth inhibition of tester strains was seen.

Table 2 Results of Dose Range Finding Test with Metabolic Activation

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertant (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Solvent control	105 106 (113) 128	15 12 (13) 12	32 25 (30) 32	28 39 (33) 31	13 13 (13) 12
	0.305	106 104 (107) 112	15 12 (13) 11	33 29 (30) 28	33 27 (32) 36	17 12 (15) 15
	1.22	125 94 (117) 132	12 13 (12) 11	27 32 (28) 24	29 36 (30) 24	12 13 (13) 13
	4.88	101 102 (101) 101	12 12 (12) 13	27 36 (30) 28	29 28 (30) 33	15 15 (14) 12
	19.5	113 120 (111) 101	11 12 (13) 17	31 23 (28) 29	27 28 (29) 33	12 16 (14) 15
	78.1	114 112 (112) 109	15 13 (13) 11	27 31 (28) 25	29 39 (34) 35	13 15 (14) 13
	313	100 100 (102) 105	17 11 (14) 15	24 28 (27) 29	27 32 (29) 27	11 11 (12) 15
	1250	0 b 0 b (0) 0 b	3 b 4 b (3) 1 b	20 b 15 b (16) 13 b	0 b 0 b (0) 0 b	1 b 4 b (3) 3 b
	5000	0 b 0 b (0) 0 b	0 b 0 b (0) 0 b	0 b 0 b (0) 0 b	0 b 0 b (0) 0 b	0 b 0 b (0) 0 b
Positive control requiring S9 mix	Name	B[a]P#4	2AA#5	2AA	B[a]P	B[a]P
	Concentration (μg/plate)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of colonies/plate	801 811 (806) 806	122 120 (126) 137	513 485 (481) 444	243 254 (250) 253	81 80 (88) 102

#4: Benzo[a]pyrene、#5: 2-Aminoanthracene

( ) :Mean of 3 plates. Rounded to the nearest whole number.

Deposition of crystals was not seen at any dose levels.

b: Growth inhibition of tester strains was seen.

Table 3 Results of Main Test without Metabolic Activation

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertant (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (−)	Solvent control	89 121 (106) 108	15 13 (13) 12	31 28 (29) 27	24 21 (22) 21	17 11 (13) 11
	19.5	94 106 (102) 105	12 17 (15) 17	− − (−) −	29 24 (26) 24	12 11 (12) 13
	39.1	128 105 (114) 110	13 12 (13) 13	− − (−) −	28 27 (27) 27	12 15 (14) 16
	78.1	121 122 (121) 121	15 15 (16) 17	29 23 (29) 35	23 27 (25) 24	13 12 (12) 11
	156	101 102 (101) 100	12 12 (12) 11	27 23 (25) 24	21 29 (25) 24	12 12 (12) 12
	313	97 102 (104) 114	12 13 (13) 15	25 31 (28) 28	21 20 (21) 21	17 11 (14) 15
	625	97 b 104 b (98) 94 b	13 b 15 b (14) 13 b	25 24 (26) 28	21 b 23 b (22) 23 b	7 b 9 b (8) 8 b
	1250	86 b 96 b (89) 85 b	8 b 8 b (8) 8 b	27 28 (27) 27	19 b 16 b (17) 16 b	5 b 5 b (6) 7 b
	2500	− − (−) −	− − (−) −	31 28 (28) 24	− − (−) −	− − (−) −
	5000	− − (−) −	− − (−) −	28 27 (29) 31	− − (−) −	− − (−) −
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2#1	SAZ#2	AF-2	AF-2	ICR-191#3
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of colonies/plate	960 988 (977) 983	390 383 (388) 390	186 168 (177) 177	483 468 (473) 467	1970 1907 (1893) 1801

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide、#2: Sodium azide、
#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine.2HCl
( ) :Mean of 3 plates. Rounded to the nearest whole number.
Deposition of crystals was not seen at any dose levels.
b: Growth inhibition of tester strains was seen.

Table 4 Results of Main Test with Metabolic Activation

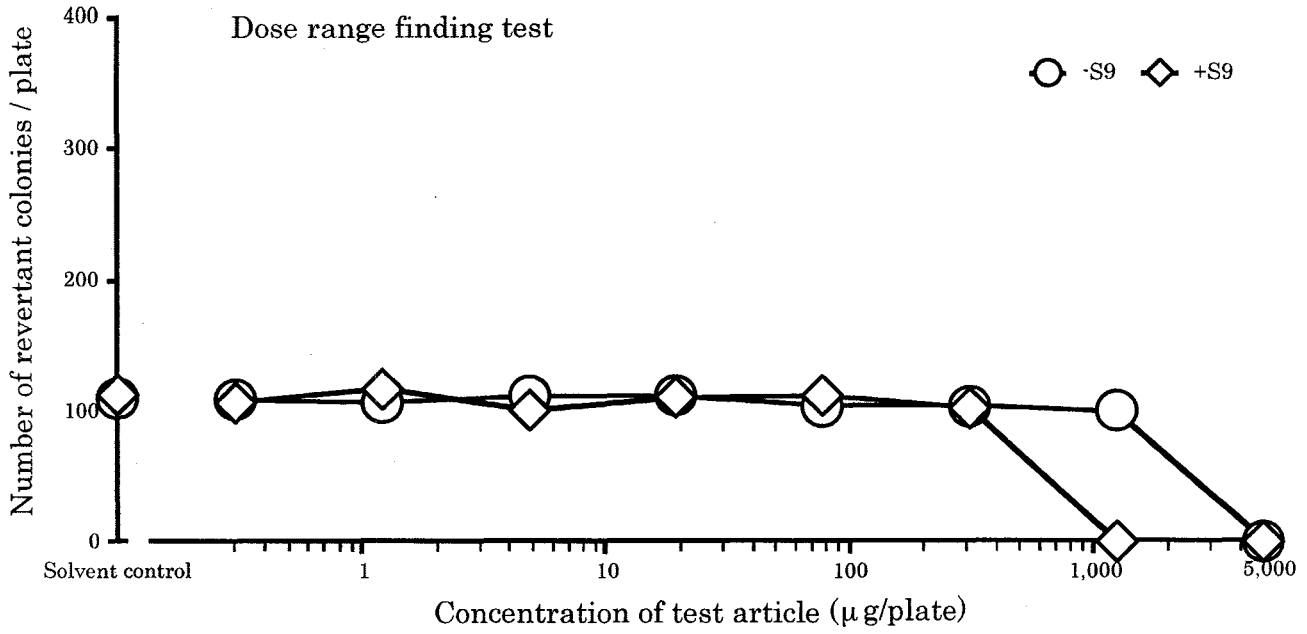
With(+) or without(-) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertant (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Solvent control	132 140 (135) 133	16 16 (16) 17	27 32 (29) 29	28 39 (34) 35	20 16 (17) 16
	19.5	108 122 (117) 121	15 16 (15) 15	32 33 (32) 32	35 37 (35) 32	13 15 (14) 15
	39.1	112 142 (130) 136	15 19 (16) 15	28 31 (30) 32	36 35 (34) 31	15 11 (13) 13
	78.1	104 116 (115) 124	15 13 (14) 15	27 32 (30) 31	31 36 (33) 32	13 16 (14) 13
	156	106 124 (115) 114	12 13 (13) 13	32 28 (30) 31	33 31 (32) 32	13 17 (15) 16
	313	114 114 (114) 114	12 13 (14) 17	29 29 (28) 25	36 33 (35) 35	17 15 (15) 13
	625	96 b 85 b (90) 89 b	7 b 7 b (6) 5 b	23 23 (22) 19	11 b 9 b (9) 8 b	7 b 9 b (8) 9 b
	1250	0 b 0 b (0) 0 b	3 b 4 b (3) 3 b	12 b 13 b (13) 15 b	0 b 0 b (0) 0 b	5 b 3 b (4) 3 b
Positive control requiring S9 mix	Name	B[a]P#4	2AA#5	2AA	B[a]P	B[a]P
	Concentration (μg/plate)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of colonies/plate	839 841 (834) 823	157 160 (162) 170	469 471 (475) 485	286 281 (282) 279	81 78 (79) 77

#4: Benzo[a]pyrene、#5: 2-Aminoanthracene

( ) :Mean of 3 plates. Rounded to the nearest whole number.

Deposition of crystals was not seen at any dose levels.

b: Growth inhibition of tester strains was seen.



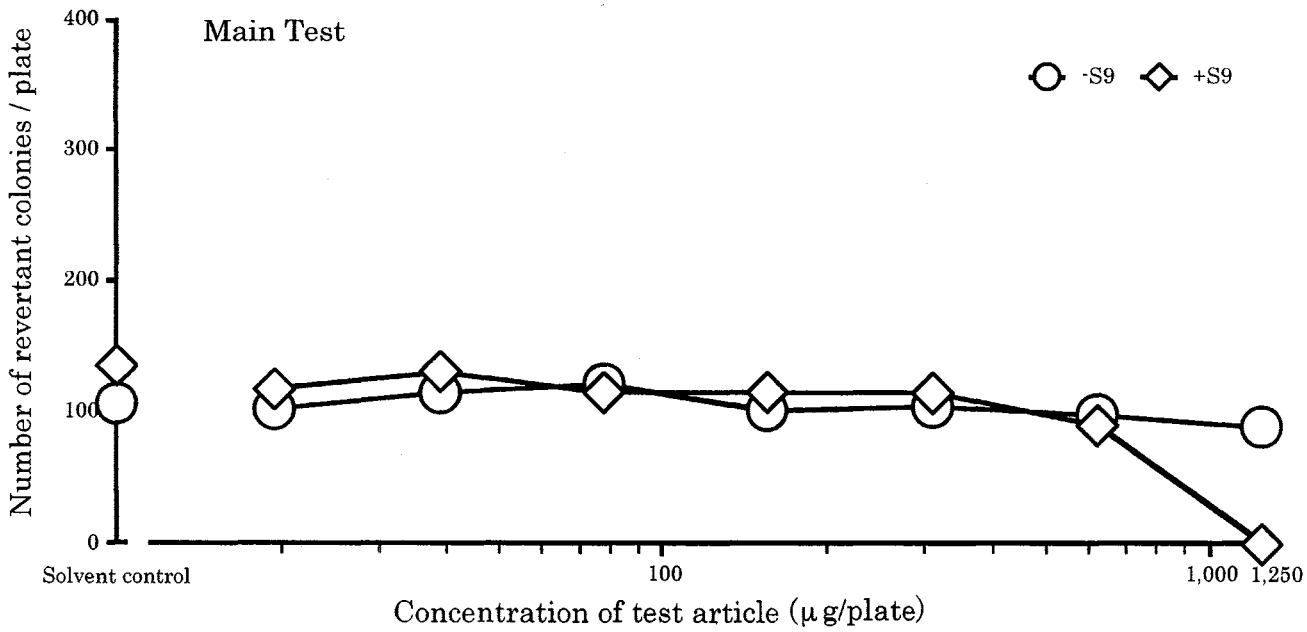
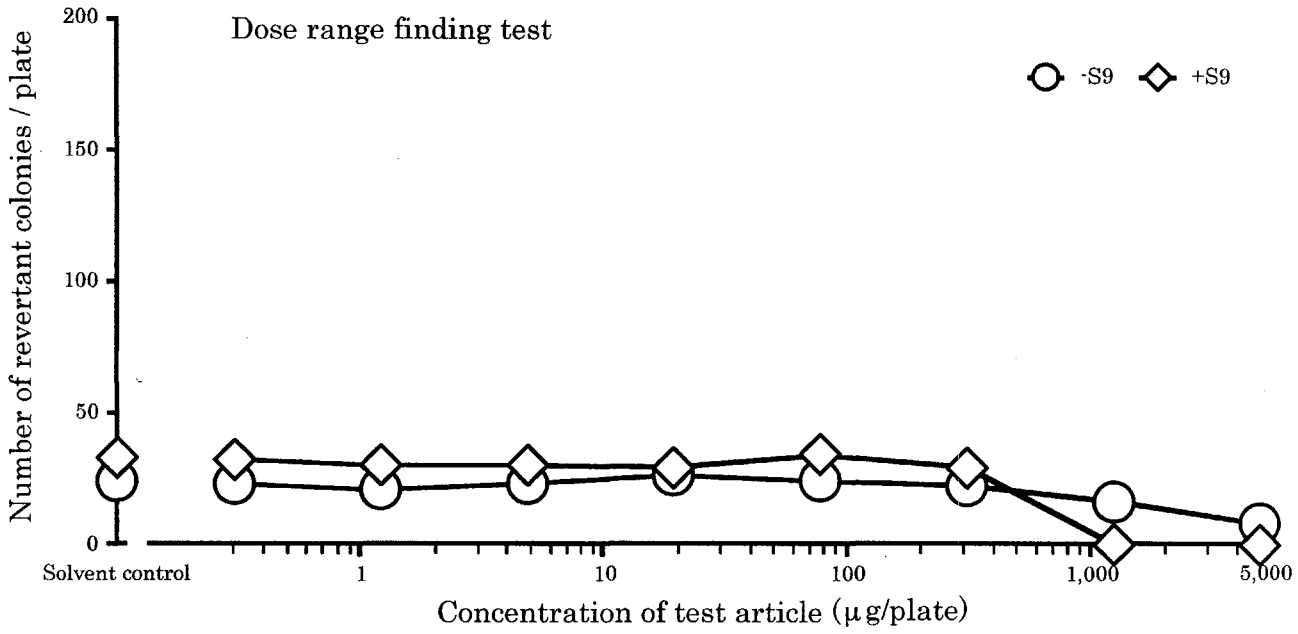


Figure 1

Concentrations and Number of Revertant Colonies in *Salmonella typhimurium* TA100



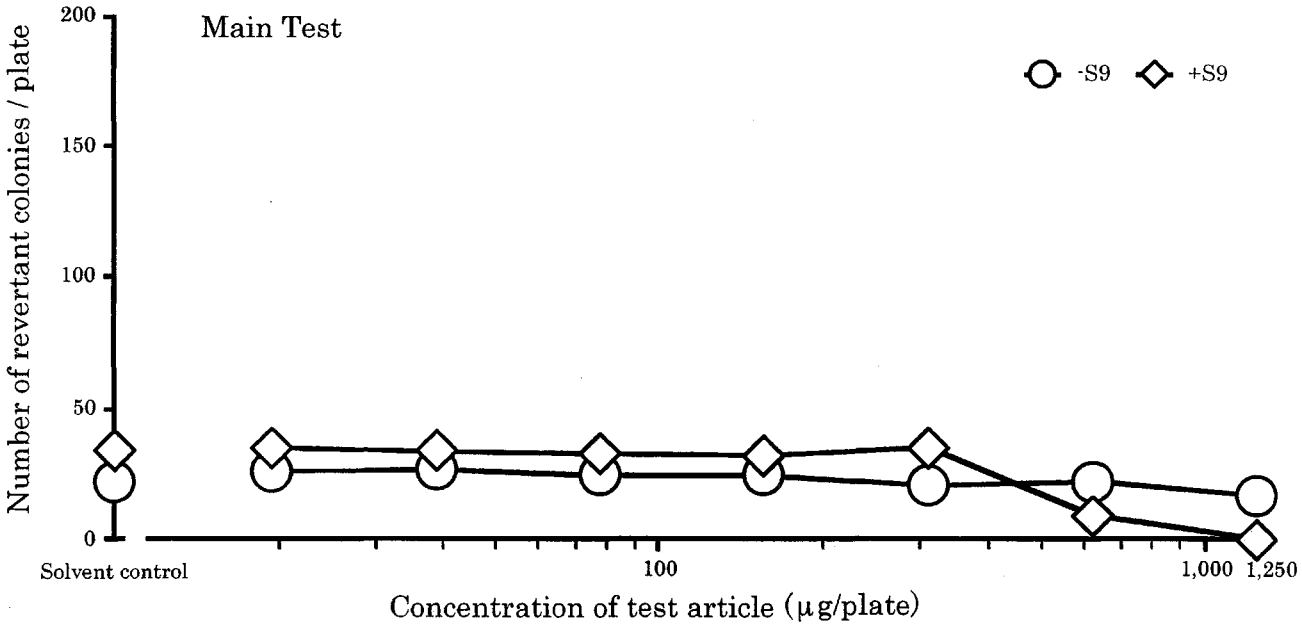
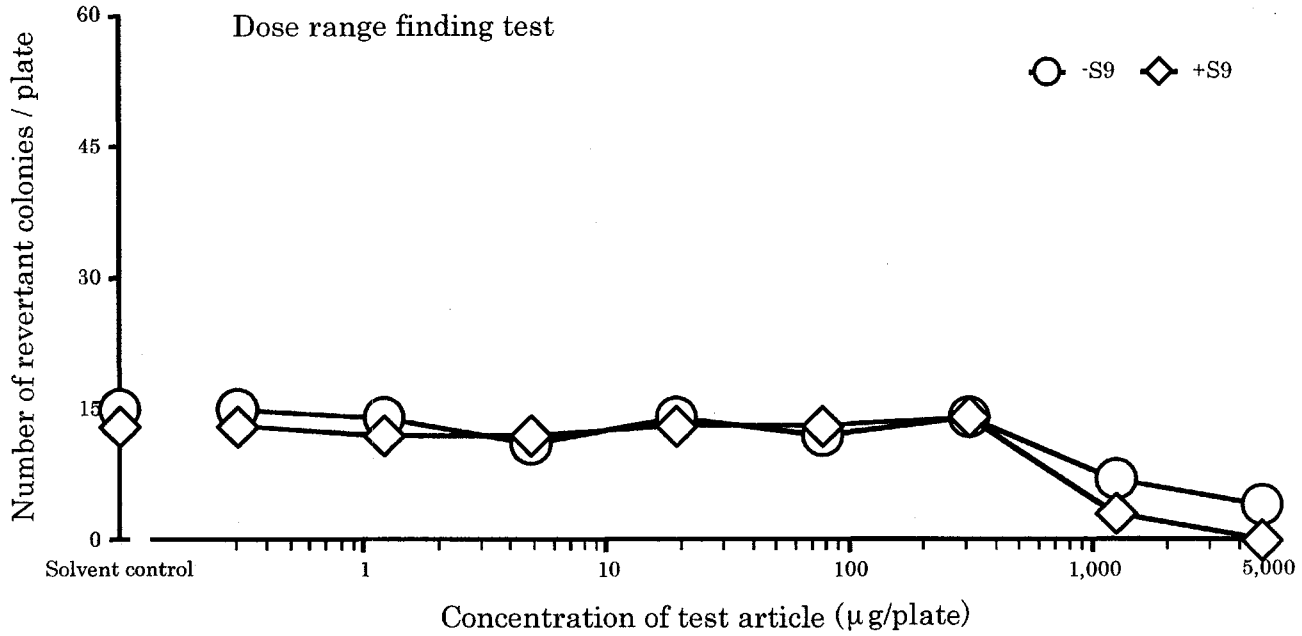


Figure 2

Concentrations and Number of Revertant Colonies in *Salmonella typhimurium* TA98



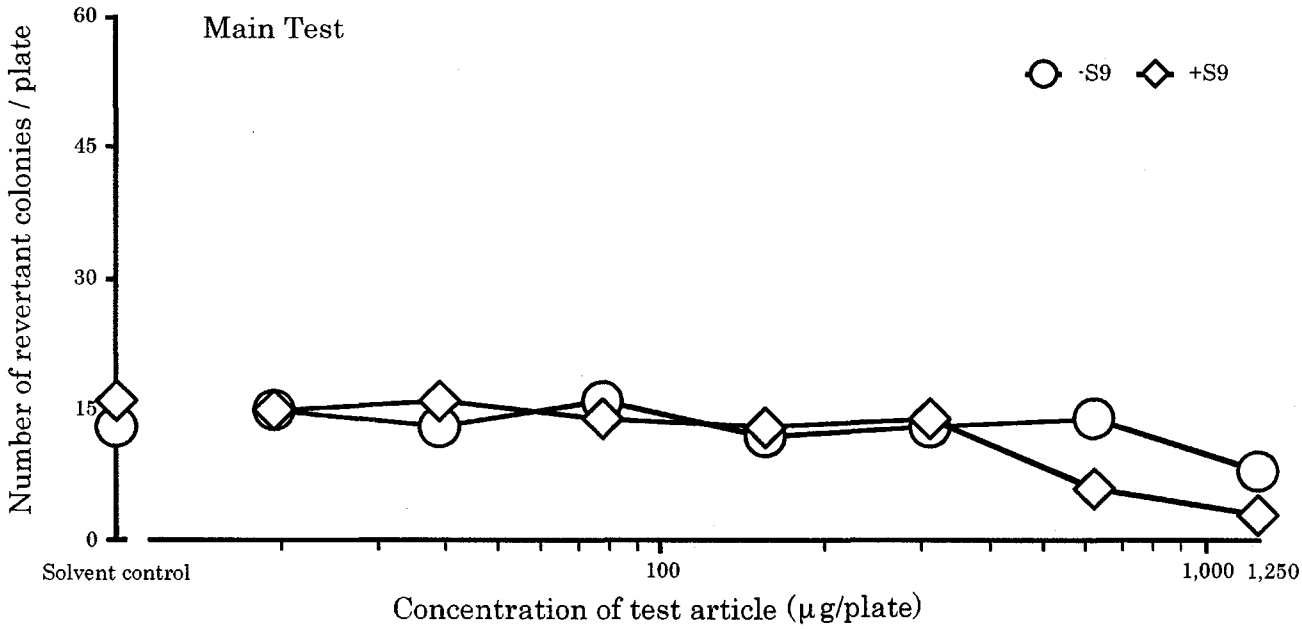
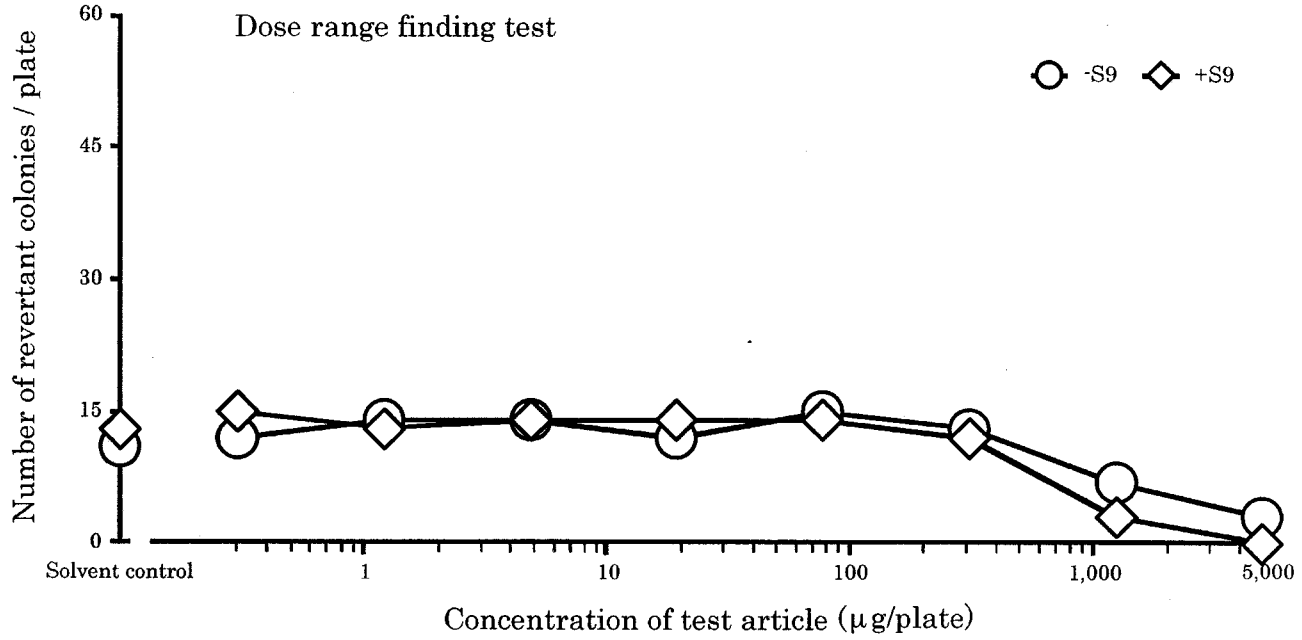


Figure 3

Concentrations and Number of Revertant Colonies in *Salmonella typhimurium* TA1535



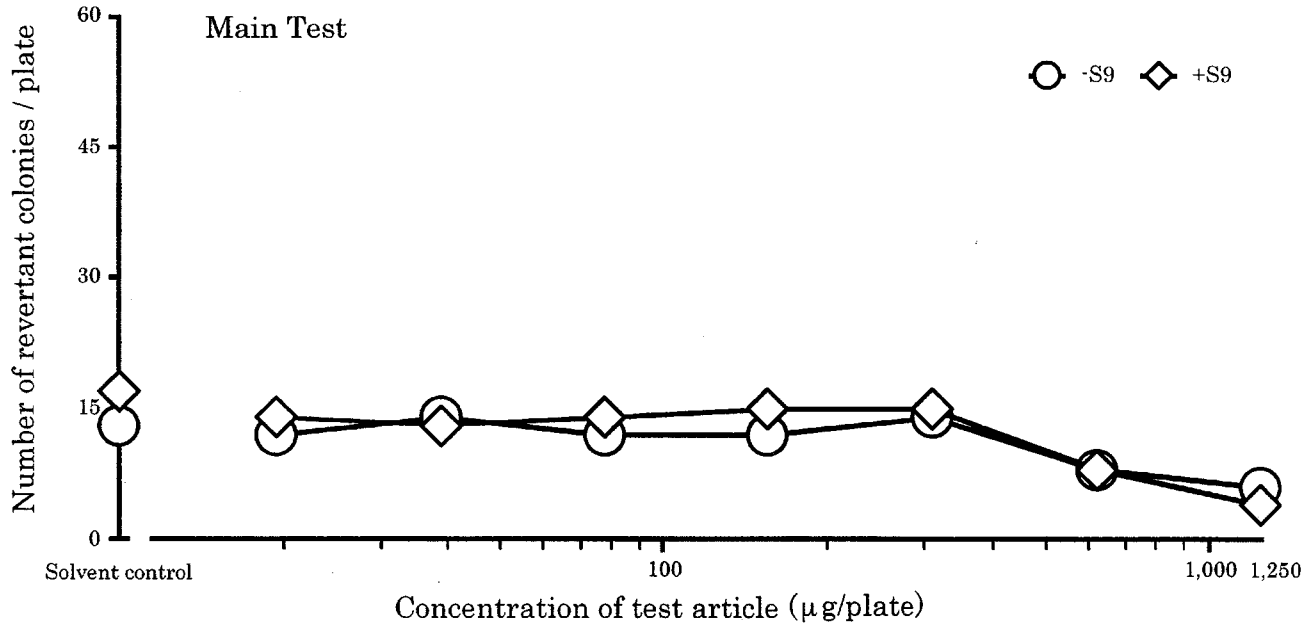
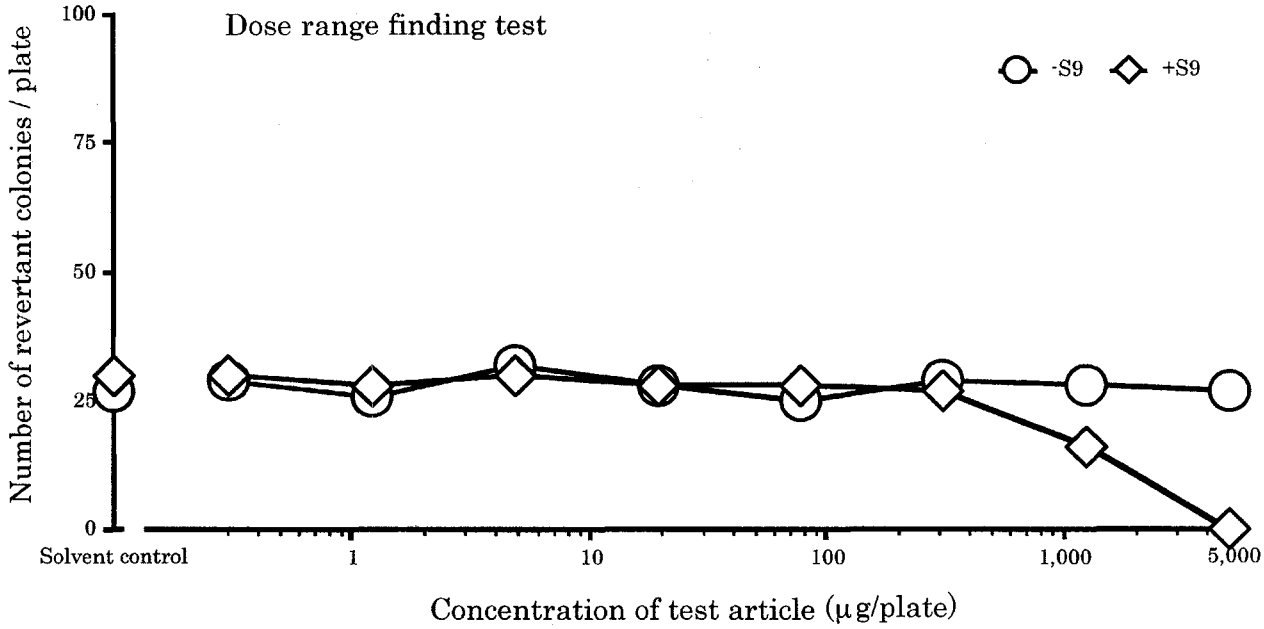


Figure 4

Concentrations and Number of Revertant Colonies in *Salmonella typhimurium* TA1537



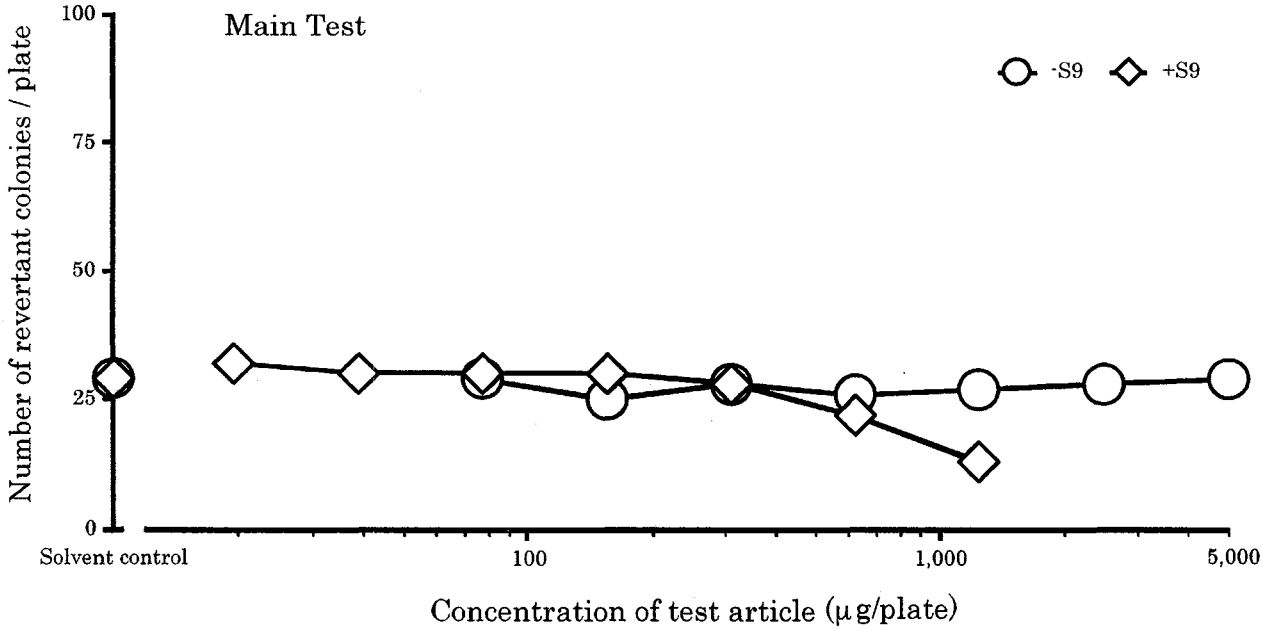


Figure 5

Concentrations and Number of Revertant Colonies in *Escherichia coli* WP2 *uvrA*