

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：3180（115-068）

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目 次

1. 要 約	7 頁
2. 試 験 題 目	8
3. 試 験 目 的	8
4. 試 験 番 号	8
9. 被 験 物 質	10
10. 試 験 材 料 お よ び 方 法	11
11. 試 験 結 果	17
12. 考 察 お よ び 結 論	19
13. 参 考 と し た 資 料	20

Figures および Tables

Figure 1	Bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain TA100	22
Figure 2	Bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain TA1535	23
Figure 3	Bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain WP2 <i>uvrA</i>	24
Figure 4	Bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain TA98	25
Figure 5	Bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain TA1537	26
Figure 6	Confirmative examination of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain TA1535	27
Table 1	Results of the bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid (1st trial) [direct method: -S9]	28
Table 2	Results of the bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid (1st trial) [activation method: +S9]	29
Table 3	Results of the bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid (2nd trial) [direct method: -S9]	30
Table 4	Results of the bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid (2nd trial) [activation method: +S9]	31
Table 5	Results of the confirmative examination of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [direct method: -S9]	32
Table 6	Results of the confirmative examination of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [activation method: +S9]	33

1. 要 約 :

本試験条件下において、2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸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。

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸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。

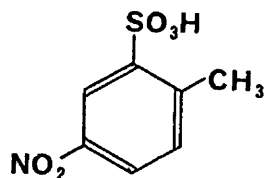
その結果、2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸処理では、直接法の TA98, TA1537 および代謝活性化法の TA100 において溶媒対照の2倍を超える復帰突然変異コロニー数の増加が認められ、用量反応相関性ならびに再現性も確認された。

一方、直接法および代謝活性化法での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

2. 試験題目 : 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の細菌を用いる
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 : 3180（115-068）

9. 被 験 物 質 :

- 1) 被験物質名 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸
2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid
- 2) CAS No. 121-03-9
- 3) ロット番号
- 4) 純 度 79.60%
- 5) 不純物の名称 水分 15.90% NaSO₄ 1.75%
および濃度 NaCl 0.01% 硫酸分 2.74%
- 6) 提 供 元
- 7) 保 管 条 件 室温
- 8) 化 学 構 造



- 9) 分 子 量 217.2
- 10) 一 般 名 4-Nitro-2-toluenesulfonic acid
5-Nitro-2-methylbenzenesulfonic acid
- 11) 物質の状態 淡黄色固体
- 12) 融 点 133.5℃
- 13) 溶 解 性 水溶性。アセトン，アルコール，エーテル，クロロホルムに可溶
- 14) 安 定 性 加熱すると激しく分解する。強酸と接触すると分解する。
- 15) 被験物質保管および
残余被験物質の処理 保管用被験物質 (1 g) 以外の残余被験物質については、
被験物質提供元に返却した。

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8年11月13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; 純度 99.7%以上, Lot No. K22063378 534) 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) に保存 (-80°C) 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)

オリエンタル酵母工業株式会社製のテスメディアAN培地 (Lot No. AN720IL, 平成8年9月13日製造) を試験に使用した。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; UNIPATH 社; Lot No. 57225)	15	g
精製水	700	ml

b. トップアガー (軟寒天)

寒天 (Bacto-agar: DIFCO 社; Lot No. 95925JD) 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; Lot No. 412E1389) - 0.5 mM D-ビオチン (関東化学株式会社, Lot No. 801S1718) 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 のバッフル付三角フラスコに 2.5% ニュートリエントブロス (UNIPATH 社; Lot No. 256 56843) 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: 東京理化工機株式会社) を用いて 4 $^{\circ}$ C 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) を用い, 37 $^{\circ}$ C で 6 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。

A TP 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) 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)	4.55	4.62	4.66	4.54	2.19
本試験 (2 回目)	4.84	4.60	4.50	4.43	2.33
本試験 (確 認)	—	4.38	—	—	—

4) S9 mix

キッコーマン株式会社製の S9 mix (Lot No. FSM-354) を試験に使用した。なお、製造後 6 ヶ月以内の S9 mix を使用した。S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質、誘導方法等ならびに S9 mix の組成を以下に示した。

a. ロット番号	RAA-354
b. 調製日	平成8年11月1日 (誘導物質投与開始後5日目)
c. 使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
d. 性 / 週齢	雄 / 7週齢
e. 体重	192 ~ 242 g
f. 臓器	肝臓
g. 誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
h. 投与量および投与回数	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)
i. 投与方法	腹腔内投与
j. 蛋白含量	25.6 mg/ml

成分	S9 mix 1 ml 中の量
S9	0.1 ml
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

5) 被験物質溶液の調製

被験物質を注射用水 (株式会社 大塚製薬工場; Lot No. K6G92) に溶解させ調製原液 (50 mg/ml = 5000 μg / プレートに相当) とした。この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。但し、本被験物質の純度は 95% 未満であるため、純度換算を行った。

6) 対照群

a. 溶媒対照

溶媒対照として、使用溶媒の注射用水のみで試験した。

b. 陽性対照

DMSO (Lot No. K22063378 534) 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°C) 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－試験ガイドラインと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 μ g/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 μ g/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 ; 純度 98.0~102.0%, Lot No. CAP0185)

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-アミノアクリジン塩酸塩 (ALDRICH 社 ; 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 S9 mix 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 S9 mix にトッパアガー 2 ml を添加し、プレート上に注いだ。37°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 S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

7) 復帰突然変異試験

a. 試験用量

用量当たり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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S 9 m i x	復 帰 突 然 変 異 コ ロ ニ ー 数				
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
0	—	99	11	17	32	17
19.5	—	128	16	18	30	13
78.1	—	109	19	16	27	17
313	—	107	17	25	23	21
1250	—	120	14	18	52	19
0	+	120	18	21	39	15
19.5	+	109	12	19	40	13
78.1	+	126	13	14	43	17
313	+	142	16	21	38	13
1250	+	143	15	20	32	21

いずれの処理群においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。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用量（公比2）を設定した。

試 験	最 高 用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)				
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
直 接 法	5000	5000	5000	5000	5000
代謝活性化法	5000	5000	5000	5000	5000

また、TA1535を用いた確認試験では1000, 2000, 3000, 4000 および 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の5用量（公差1000）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 μl 、次いで直接法の場合、0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.4）を500 μl 、代謝活性化法の場合、S9 mix を500 μl 分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液100 μl 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℃で20分間振盪培養（プレインキュベーション）した。培養終了後、トップアガーを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。重層したトップアガーが固化した後、恒温器を用いて37℃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。また、再現性を確認するため、本試験を独立して2回実施した。

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（×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）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。

11. 試 験 結 果 :

1) 本試験 (1回目)

試験結果を Figure 1~5 および Table 1~2 に示した。

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸処理による生育阻害作用は、直接法ならびに代謝活性化法とも観察されなかった。

直接法の TA98, TA1537 および代謝活性化法 TA100 において、復帰突然変異コロニー数の増加傾向が観察され、いずれの菌株とも溶媒対照群の値と比較して2倍以上の増加であった。

一方、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、試験期間中に被験物質の析出等特筆すべき変化は観察されなかった。

2) 本試験 (2回目)

試験結果を Figure 1~5 および Table 3~4 に示した。

被験物質処理による生育阻害作用はいずれの試験用量においても観察されなかった。復帰突然変異コロニー数については直接法のネズミチフス菌および代謝活性化法の TA100 において溶媒対照群の2倍を超える増加が認められた。

一方、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、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

3) 確認試験

以上2回の試験において TA1535 での復帰突然変異コロニー数が溶媒対照の1.5~2倍程度を示したことから、1000~5000 μg /プレートの5用量を用いた確認試験を実施した。

試験結果を Figure 6 および Table 5~6 に示した。

直接法ならびに代謝活性化法とも、被験物質処理による明確な復帰突然変異誘発作用は確認されなかった。

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)	-	TA98	625 μ g/プレート	42.1
	-	TA1537	5000 μ g/プレート	4.9
	+	TA100	5000 μ g/プレート	28.1
本試験 (2回目)	-	TA100	5000 μ g/プレート	31.2
	-	TA98	2500 μ g/プレート	25.6
	-	TA1537	5000 μ g/プレート	4.9
	+	TA100	5000 μ g/プレート	33.9

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において, 菌の増殖は認められなかった.

以上の試験において, 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.

12. 考察および結論：

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の変異原性，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 5000 μg /プレートまで検討した。その結果，2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸処理群では直接法の TA100，TA98 および TA1537，代謝活性化法の TA100 で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。

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42.1と算出され，既知変異原性物質に比較して2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の変異原性が非常に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-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸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。

なお，類縁化合物であるメチル *p*-ニトロベンゼンスルホネートおよび *p*-トルエンスルホン酸の変異原性についての報告はなかった。

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. Mutat. 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.
- Maron, D. M. and Ames, B.N. : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 113, 173 ~ 215, 1983.

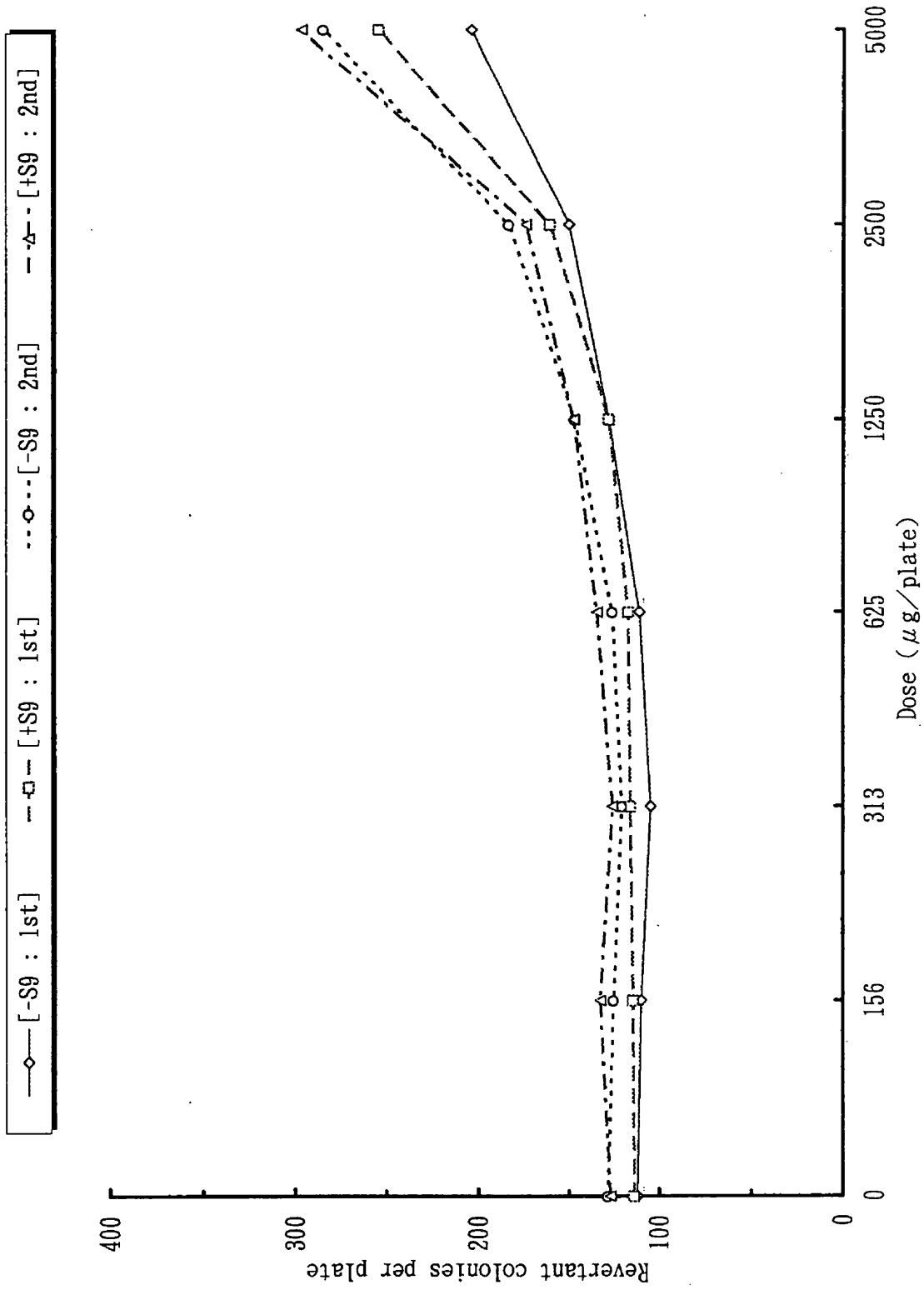


Figure 1. Bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain TA100

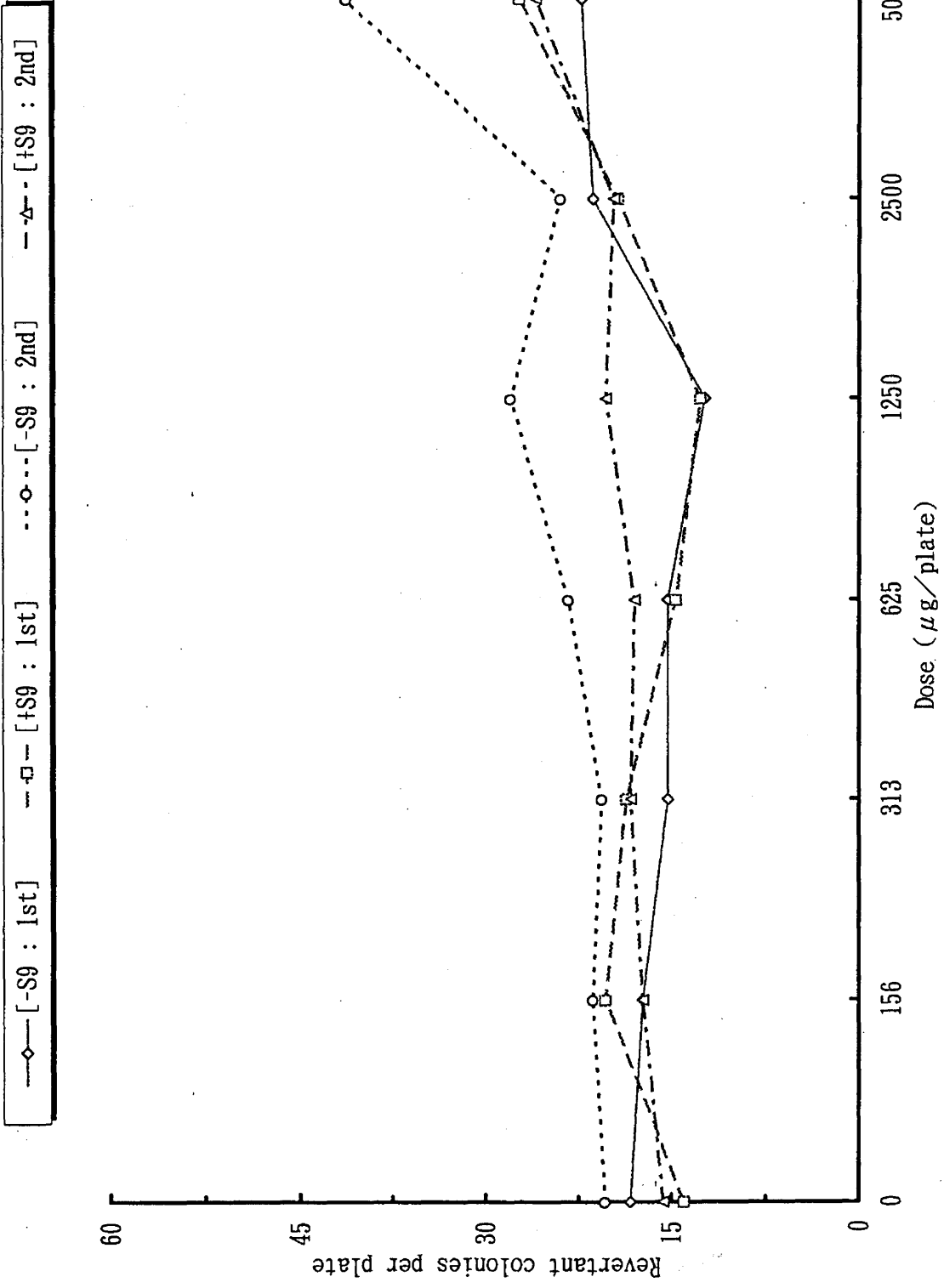


Figure 2. Bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain TA1535

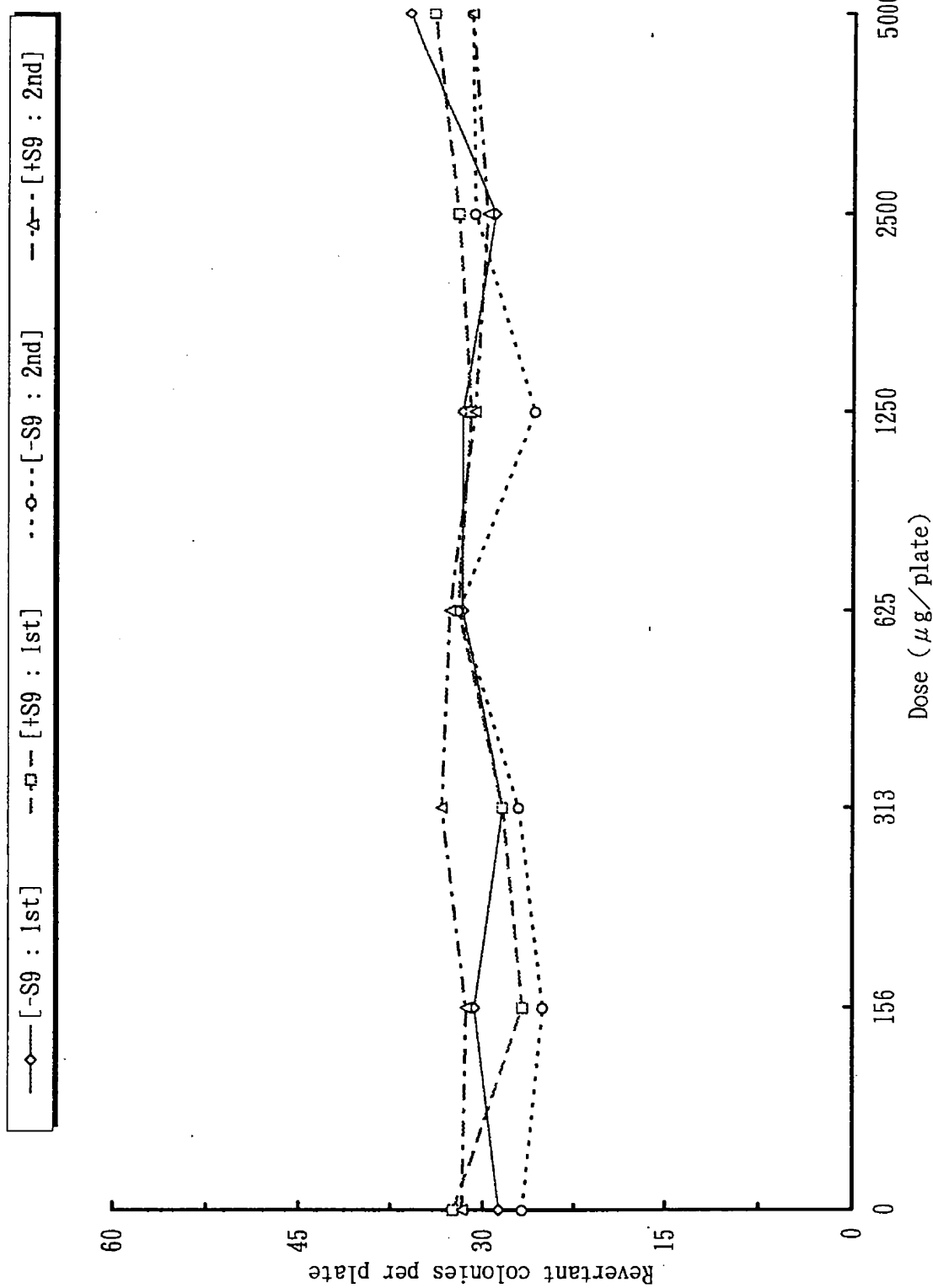


Figure 3. Bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain WP2uvrA

—◇— [-S9 : 1st] -□- [+S9 : 1st] ...○... [-S9 : 2nd] -△- [+S9 : 2nd]

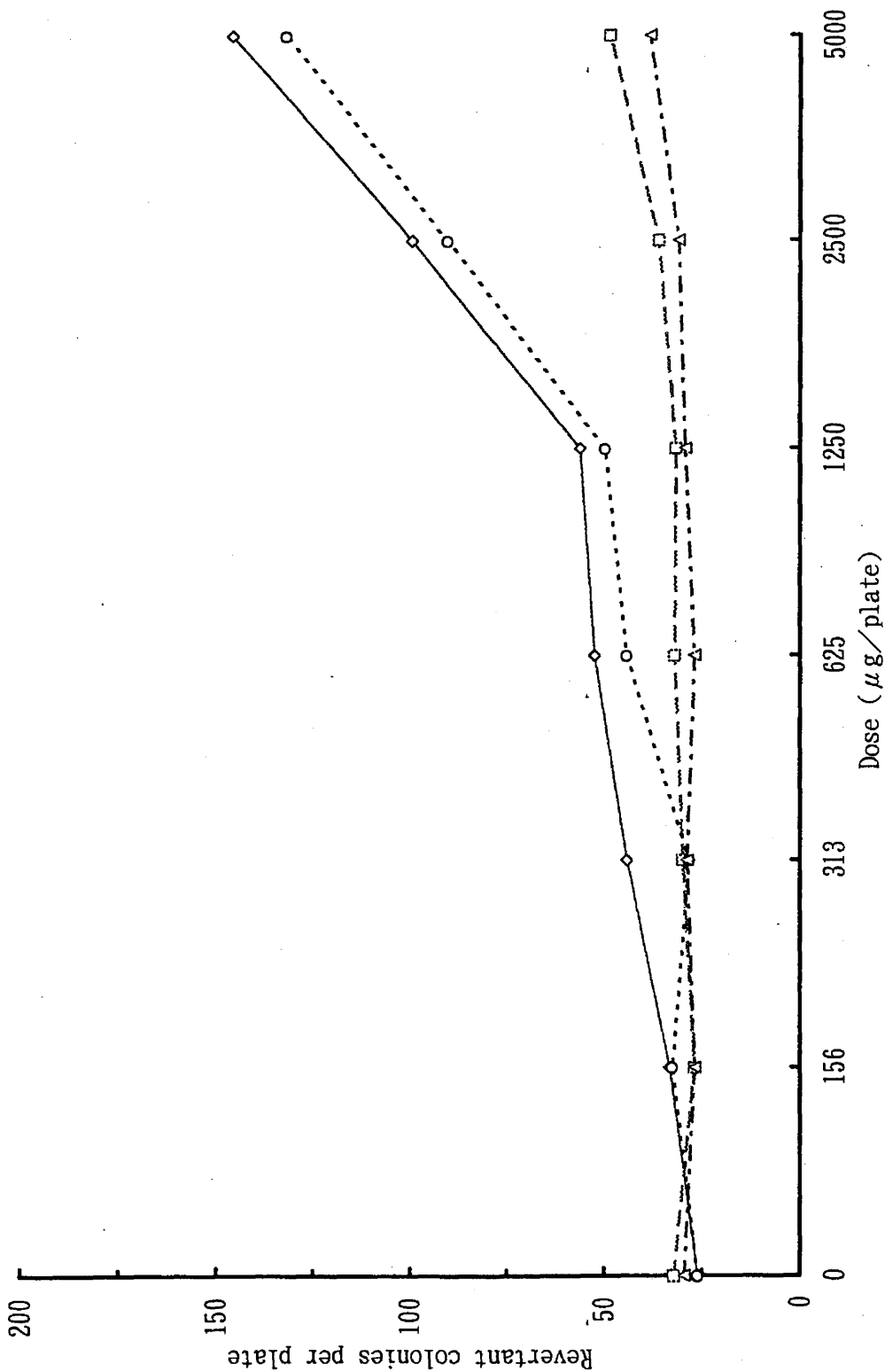


Figure 4. Bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain TA98

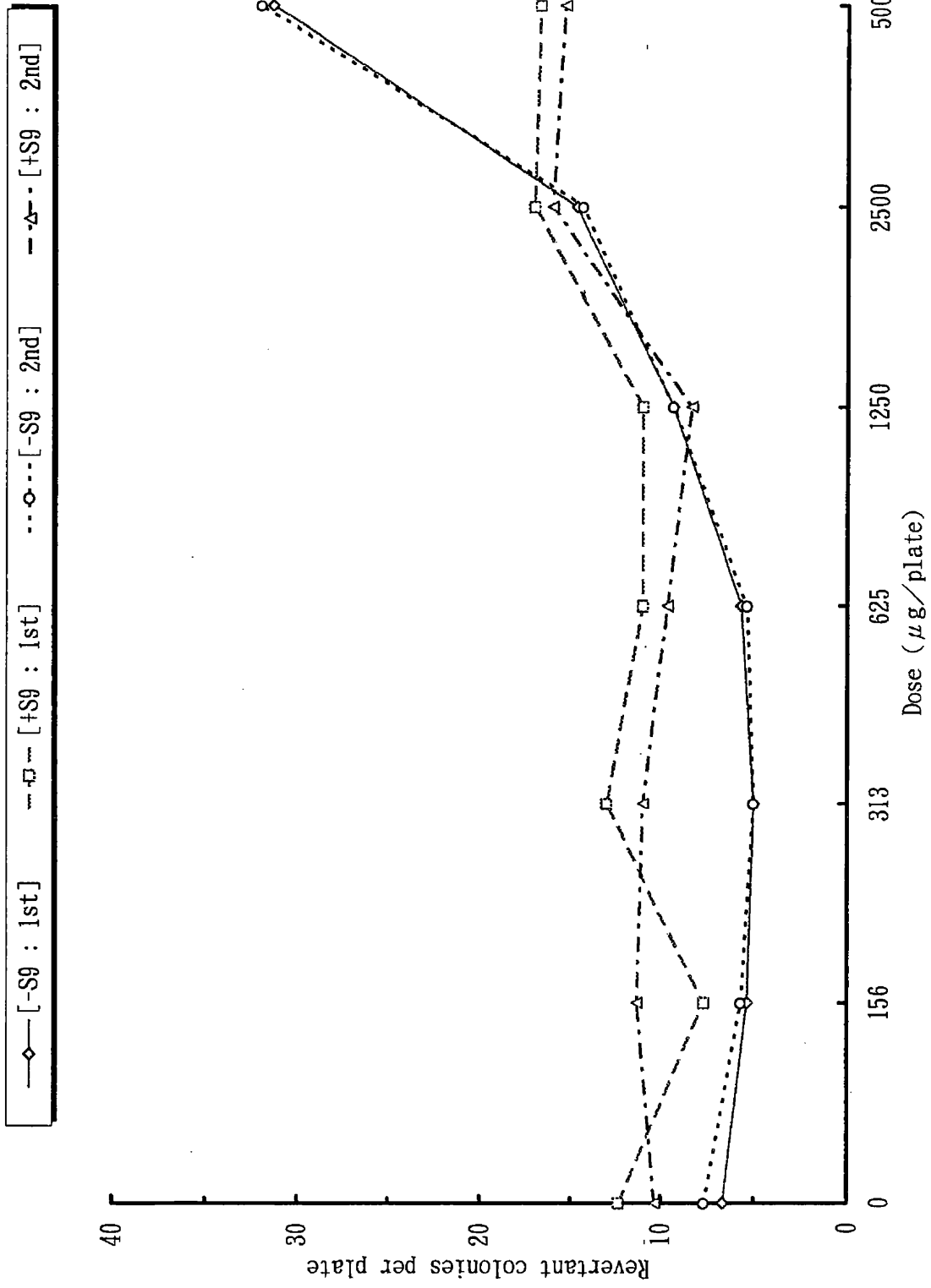


Figure 5. Bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain TA1537

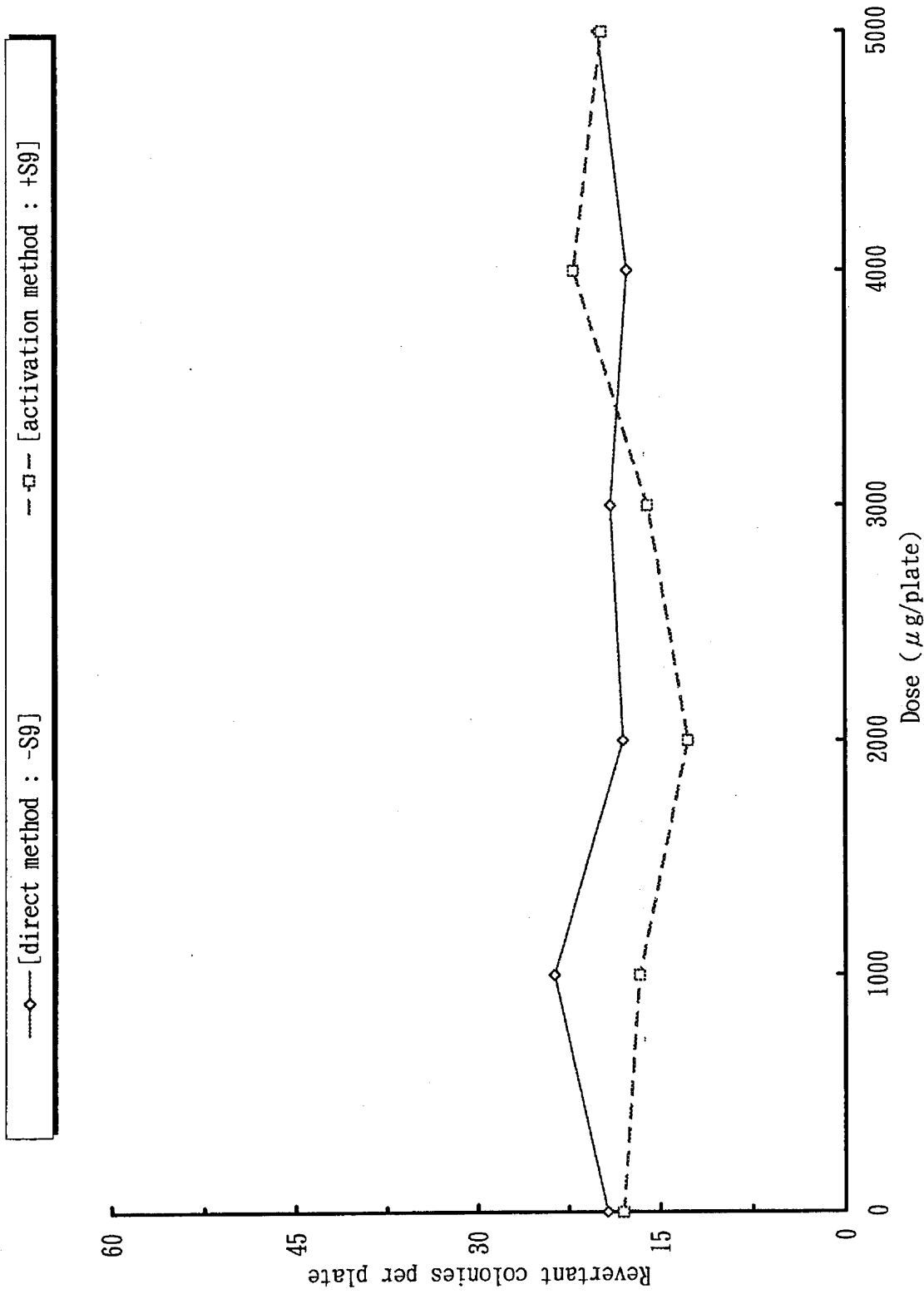


Figure 6. Confirmative examination of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid in strain TA1535

Table 1. Results of the bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid (1st trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S. D.]				
		TA100	TA1535	WP2 uv7A	TA98	TA1537
D. W. #	0	110 [112 \pm 2]	19 19 17 [18 \pm 1]	30 28 28 [29 \pm 1]	21 27 26 [26 \pm 1]	7 7 6 [7 \pm 1]
Test substance	156	108 108 114 [110 \pm 3]	18 13 21 [17 \pm 4]	36 26 30 [31 \pm 5]	30 30 39 [33 \pm 5]	4 6 6 [5 \pm 1]
	313	107 101 106 [105 \pm 3]	15 17 14 [15 \pm 2]	28 27 30 [28 \pm 2]	40 46 46 [44 \pm 3]	5 5 5 [5 \pm 0]
	625	107 115 111 [111 \pm 4]	15 16 15 [15 \pm 1]	35 30 30 [32 \pm 3]	55 53 49 [52 \pm 3]	6 6 5 [6 \pm 1]
	1250	119 134 131 [128 \pm 8]	12 10 15 [12 \pm 3]	25 36 34 [32 \pm 6]	52 54 62 [56 \pm 5]	9 11 8 [9 \pm 2]
	2500	140 146 164 [150 \pm 12]	24 22 18 [21 \pm 3]	28 29 30 [29 \pm 1]	84 109 104 [99 \pm 13]	15 13 16 [15 \pm 2]
	5000	206 195 210 [204 \pm 8]	24 22 21 [22 \pm 2]	34 33 41 [36 \pm 4]	147 139 149 [145 \pm 5]	30 36 28 [31 \pm 4]
Positive control		573 598 599 ^{a)} [590 \pm 15]	403 413 363 ^{b)} [393 \pm 26]	155 180 190 ^{a)} [175 \pm 18]	456 451 457 ^{c)} [455 \pm 3]	534 530 537 ^{d)} [534 \pm 4]

: Solvent control

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 hydrochloride, 80 μ g/plate

Table 2. Results of the bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid (1st trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]					
		TA100	TA1535	WP2 uvra	TA98	TA1537	
DMSO#	0	109 [114 \pm 6]	16 14 12 [14 \pm 2]	35 35 27 [32 \pm 5]	32 30 34 [32 \pm 2]	14 10 13 [12 \pm 2]	
Test substance	156	113 119 111 [114 \pm 4]	21 18 22 [20 \pm 2]	27 26 27 [27 \pm 1]	27 28 25 [27 \pm 2]	7 8 8 [8 \pm 1]	
	313	109 130 109 [116 \pm 12]	16 20 20 [19 \pm 2]	30 27 28 [28 \pm 2]	26 30 33 [30 \pm 4]	15 13 11 [13 \pm 2]	
	625	115 119 117 [117 \pm 2]	18 14 12 [15 \pm 3]	35 28 33 [32 \pm 4]	33 31 31 [32 \pm 1]	14 9 10 [11 \pm 3]	
	1250	112 133 139 [128 \pm 14]	11 13 14 [13 \pm 2]	32 32 29 [31 \pm 2]	29 31 34 [31 \pm 3]	11 10 12 [11 \pm 1]	
	2500	158 162 162 [161 \pm 2]	19 22 17 [19 \pm 3]	30 35 31 [32 \pm 3]	36 33 38 [36 \pm 3]	17 18 16 [17 \pm 1]	
	5000	260 249 254 [254 \pm 6]	29 25 28 [27 \pm 2]	32 41 29 [34 \pm 6]	46 53 46 [48 \pm 4]	17 19 14 [17 \pm 3]	
Positive control		732 739 728 ^a [733 \pm 6]	387 396 375 ^b [386 \pm 11]	411 432 396 ^c [413 \pm 18]	382 365 351 ^d [366 \pm 16]	171 143 163 ^b [159 \pm 14]	

: Solvent control

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate b) : 2-AA, 2 μ g/plate c) : 2-AA, 10 μ g/plate d) : 2-AA, 0.5 μ g/plate

Table 3. Results of the bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]												
		TA100	TA1535	WP2 uvra	TA98	TA1537								
DMSO#	0	123 [129 \pm 5]	130 [129 \pm 5]	133 [129 \pm 5]	18 [20 \pm 3]	20 [20 \pm 3]	23 [27 \pm 4]	28 [26 \pm 2]	24 [26 \pm 2]	26 [26 \pm 2]	28 [26 \pm 2]	8 [8 \pm 1]	8 [8 \pm 1]	7 [6 \pm 1]
Test substance	156	119 [125 \pm 6]	126 [125 \pm 6]	131 [125 \pm 6]	23 [21 \pm 3]	23 [21 \pm 3]	18 [25 \pm 0]	25 [25 \pm 0]	30 [32 \pm 3]	35 [32 \pm 3]	32 [32 \pm 3]	5 [6 \pm 1]	7 [6 \pm 1]	5 [5 \pm 0]
	313	117 [121 \pm 3]	122 [121 \pm 3]	123 [121 \pm 3]	23 [21 \pm 3]	22 [21 \pm 3]	17 [27 \pm 3]	24 [27 \pm 3]	28 [28 \pm 2]	26 [28 \pm 2]	30 [28 \pm 2]	5 [5 \pm 0]	5 [5 \pm 0]	5 [5 \pm 0]
	625	122 [126 \pm 9]	120 [126 \pm 9]	136 [126 \pm 9]	26 [23 \pm 3]	23 [23 \pm 3]	21 [32 \pm 5]	35 [32 \pm 5]	44 [44 \pm 3]	41 [44 \pm 3]	47 [44 \pm 3]	5 [5 \pm 1]	5 [5 \pm 1]	6 [5 \pm 1]
	1250	136 [147 \pm 9]	152 [147 \pm 9]	152 [147 \pm 9]	25 [28 \pm 4]	27 [28 \pm 4]	32 [26 \pm 3]	29 [26 \pm 3]	45 [50 \pm 4]	51 [50 \pm 4]	53 [50 \pm 4]	8 [9 \pm 2]	9 [9 \pm 2]	11 [9 \pm 2]
	2500	185 [183 \pm 3]	185 [183 \pm 3]	179 [183 \pm 3]	25 [24 \pm 2]	25 [24 \pm 2]	22 [31 \pm 1]	30 [31 \pm 1]	82 [90 \pm 8]	90 [90 \pm 8]	98 [90 \pm 8]	16 [14 \pm 2]	14 [14 \pm 2]	13 [14 \pm 2]
	5000	285 [285 \pm 1]	285 [285 \pm 1]	284 [285 \pm 1]	36 [41 \pm 6]	40 [41 \pm 6]	48 [31 \pm 3]	30 [31 \pm 3]	130 [131 \pm 2]	134 [131 \pm 2]	130 [131 \pm 2]	28 [32 \pm 4]	33 [32 \pm 4]	35 [32 \pm 4]
Positive control		537 [543 \pm 11]	536 [543 \pm 11]	555 ^{a)} [543 \pm 11]	471 [455 \pm 42]	487 [455 \pm 42]	407 ^{b)} [188 \pm 11]	190 ^{c)} [188 \pm 11]	454 [470 \pm 23]	496 [470 \pm 23]	460 ^{d)} [470 \pm 23]	533 [556 \pm 22]	577 [556 \pm 22]	559 ^{d)} [556 \pm 22]

: Solvent control

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/platec): AF-2, 0.1 μ g/plate d): ACR; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid (2nd trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]					
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
DMSO#	0	125 [127 \pm 3]	16 14 17 [16 \pm 2]	27 34 34 [32 \pm 4]	35 26 27 [29 \pm 5]	11 12 8 [10 \pm 2]	
Test substance	156	134 134 130 [133 \pm 2]	19 17 16 [17 \pm 2]	33 30 31 [31 \pm 2]	26 24 30 [27 \pm 3]	15 11 8 [11 \pm 4]	
	313	136 114 128 [126 \pm 11]	18 23 14 [18 \pm 5]	29 36 35 [33 \pm 4]	28 28 30 [29 \pm 1]	10 11 12 [11 \pm 1]	
	625	146 123 134 [134 \pm 12]	17 22 15 [18 \pm 4]	29 30 39 [33 \pm 6]	29 24 27 [27 \pm 3]	9 12 8 [10 \pm 2]	
	1250	159 146 137 [147 \pm 11]	21 22 18 [20 \pm 2]	30 28 34 [31 \pm 3]	25 26 36 [29 \pm 6]	8 9 8 [8 \pm 1]	
	2500	164 172 185 [174 \pm 11]	19 21 19 [20 \pm 1]	28 28 33 [30 \pm 3]	30 31 31 [31 \pm 1]	15 16 17 [16 \pm 1]	
	5000	295 311 283 [296 \pm 14]	26 26 26 [26 \pm 0]	36 26 31 [31 \pm 5]	34 39 41 [38 \pm 4]	13 16 17 [15 \pm 2]	
Positive control		711 692 693 ^{b)} [699 \pm 11]	383 352 393 ^{b)} [376 \pm 21]	469 468 459 ^{c)} [465 \pm 6]	366 358 392 ^{d)} [372 \pm 18]	163 171 149 ^{b)} [161 \pm 11]	

: Solvent control

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

Table 5. Results of the confirmative examination of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]			
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98
DMSO#	0	-	17 20 21 [19 \pm 2]	-	-
Test substance	1000	-	20 22 29 [24 \pm 5]	-	-
	2000	-	16 18 20 [18 \pm 2]	-	-
	3000	-	18 19 20 [19 \pm 1]	-	-
	4000	-	17 16 20 [18 \pm 2]	-	-
	5000	-	19 22 19 [20 \pm 2]	-	-
Positive control	-	-	480 442 435 ^{b)} [452 \pm 24]	-	-

: Solvent control - : Not tested
b) : NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/plate

Table 6. Results of the confirmative examination of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]			
		TA100	TA1535	WP2 uvra	TA98
DMSO#	0	-	15 19 20 [18 \pm 3]	-	-
Test substance	1000	-	17 17 16 [17 \pm 1]	-	-
	2000	-	13 12 13 [13 \pm 1]	-	-
	3000	-	15 17 16 [16 \pm 1]	-	-
	4000	-	25 20 21 [22 \pm 3]	-	-
	5000	-	19 22 18 [20 \pm 2]	-	-
Positive control		-	361 298 354 ^{b)} [338 \pm 35]	-	-

: Solvent control - : Not tested

b) : 2-AA, 2 μ g/plate