m-ニトロ安息香酸の
細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室　委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

目次

要約 ---------- 1
試験目的 ---------- 1
試験ガイドラインとGLP ---------- 1
材料と方法 ---------- 2
1. 被験物質 ---------- 2
2. 陽性対照物質 ---------- 2
3. 検定菌 ---------- 3
4. 試験材料 ---------- 3
5. 被験物質調製液の調製 ---------- 5
6. 試験操作 ---------- 5
7. 結果の表示 ---------- 8
8. 判定 ---------- 8
予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び
試験計画書に従わなかったこと ---------- 8
結果と考察 ---------- 9
1. 用量設定試験 ---------- 9
2. 本試験 ---------- 9
参考文献 ---------- 10
Tables ---------- 12
Figures ---------- 15

要約

m-ニトロ安息香酸の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、陽性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、プレインキュベーション法により、S9 mix 非存在下および存在下で試験を行った。

用量設定試験を 50.0、150、500、1500 および 5000 μg/plate の 5 用量を設定して行ったところ、TA98 の S9 mix 存在下の 5000 μg/plate の用量で生育阻害が認められた。また、TA100 および TA1537 の S9 mix 非存在下および存在下と、TA98 の S9 mix 非存在下において、変異コロニー数の増加が認められた。

これらの結果に基づき、すべての検定菌で最高用量を 5000 μg/plate とし、TA100 では公比 2 で 8 用量(39.1～5000 μg/plate)、TA1535 および WP2 *uvrA* では公比 2 で 5 用量(313～5000 μg/plate)、TA98 では公比 2 で 6 用量(156～5000 μg/plate)、TA1537 では公比 2 で 7 用量(78.1～5000 μg/plate)をそれぞれ設定して、本試験 I および本試験 II を行った。その結果、2 回の本試験ともに、TA100 および TA1537 の S9 mix 非存在下および存在下と、TA1535 および TA98 の S9 mix 非存在下において、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められ、その増加には用量依存性および再現性が認められた。

以上の結果から、*m*-ニトロ安息香酸は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判定した。

試験目的

m-ニトロ安息香酸の遺伝子突然変異誘発性(変異原性)の有無を検討し、安全性評価の資料とするために、*m*-ニトロ安息香酸について細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法 [1] により実施した。

試験ガイドラインと GLP

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、一部改正 平成 17 年 4 月 1

日)および「OECD 化学物質試験法ガイドライン 471/細菌を用いる復帰突然変異試験」(1997 年 7 月 21 日採択)に準拠し、「化学物質 GLP」(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、最終改正 平成 17 年 4 月 1 日)を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である *m*-ニトロ安息香酸[別名:3-ニトロ安息香酸、英名:3-nitrobenzoic acid、略称:NBA、分子式:$C_7H_5NO_4$、ロット番号: 含量:99.4%、製造:]は、わずかにうすい黄色結晶性粉末である。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。被験物質は 使用時まで密閉容器に入れ、遮光条件下で室温保管した。

被験物質原体の安定性については、被験物質提供者において、実験終了後に返却した被験物質の含量を分析した結果、被験物質は実験期間中安定であったことが確認された(Appendix 2、GLP 基準外)。なお、被験物質原体の安定性については GLP 基準下での確認はされていないが、化学的根拠に基づいた資料であることから、実験期間中安定であり、当該試験の信頼性に影響しないと判断した。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌に用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれを結果の各 Table 中に示した。

名称	略称	ロット番号(購入日)	製造者	純度
2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	AF-2	CKQ1402 (2001 年 9 月 13 日)	和光純薬工業	99.0%
ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	SA	ELE2329 (2001 年 5 月 15 日)	和光純薬工業	99.2%
9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	9AA	106F06681 (2001 年 5 月 15 日)	Sigma Chemical	97%以上
ﾍﾞﾝｿﾞ[a]ﾋﾟﾚﾝ	B[a]P	EWJ5277 (2005 年 12 月 16 日)	和光純薬工業	100.1%
2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ	2AA	DWK5667 (2001 年 9 月 13 日)	和光純薬工業	97.4%

AF-2、9AA、B[a]P および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO、ロット番号:LTQ5318、和光純薬工

業)に、SAは日局注射用水(製造番号:K6A81、大塚製薬工場)に溶解し、所定の濃度に調製した後、冷凍保存(設定温度:-20℃)し、調製後 6 か月以内に用時に解凍して用いた。各陽性対照物質調製液の調製濃度および添加量を以下に示す。

菌　株	S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
	物質名 (添加量:μL/plate)	調製濃度 (μg/mL)	物質名 (添加量:μL/plate)	調製濃度 (μg/mL)
Salmonella typhimurium				
TA100	AF-2(100)	0.1	B[a]P(100)	50
TA1535	SA (100)	5	2AA(20)	100
TA98	AF-2(100)	1	B[a]P(100)	50
TA1537	9AA(100)	800	B[a]P(100)	50
Escherichia coli				
WP2 *uvrA*	AF-2(100)	0.1	2AA(100)	100

3. 検定菌

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、試験には、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌(*Escherichia coli*)WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 の 4 菌株は 1997 年 8 月 7 日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は 1997 年 4 月 9 日に、いずれも日本バイオアッセイ研究センターの　　より分与された。*S. typhimurium* の 4 菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異[2]、*E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異[3]を指標とした遺伝子突然変異誘発性の検出系である。

検定菌は凍結保存(設定温度:-80℃)したものを用いた。凍結保存菌は、液体培地にて 37℃で静止期の初期まで培養した菌液 0.8 mL に対し、滅菌 DMSO を 0.07 mL の割合で加え、急速凍結して調製した。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV 感受性、膜変異(*rfa*)、アンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べ、特性が維持されていることを確認し、試験に用いた。

4. 試験材料

1)最少グルコース寒天平板培地

極東製薬工業で製造した最少グルコース寒天平板培地(ロット番号:DZA76901、2006年6月9日製造)を購入して用いた。なお、培地 1 L あたりの組成は以下のとおりで、径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

硫酸マグネシウム・七水和物	0.2	g
クエン酸・一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	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
グルコース	20	g
大洋寒天(清水食品)	15	g

2)トップアガー

水溶液(A)をオートクレーブ滅菌した後、フィルター滅菌した(B)または(C)を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A)	バクトアガー(Difco)	0.6 w/v%
	塩化ナトリウム	0.5 w/v%
(B)	*Salmonella typhimurium* 用	
	L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
	D-ビオチン	0.5 mmol/L
(C)	*Escherichia coli* 用	
	L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3)ラット肝臓から調製した S9

キッコーマンで製造した S9(ロット番号:RAA-545、2006 年 6 月 9 日製造)を購入して用いた。

①動物　Sprague-Dawley 系ラット、雄:7 週齢

②誘導方法　フェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)を、1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg 腹腔内投与した。

③S9 調製　5 日目に致死させて摘出した肝臓を生理食塩液で灌流したのち、3 倍量の 0.15 mol/L 塩化カリウム溶液を加えてホモジナイズし、9000×g で 10 分間遠沈して得た上清画分。

④保存条件　凍結保存(設定温度:-80℃)し、製造後 6 か月以内に使用した。

4)S9 mix の組成および調製

S9 mix 1 mL あたりの組成は以下のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

成　分	S9 mix 1 mL 中の量	調製濃度
S9	0.1 mL	10 vol%
0.2 mol/L ナトリウムーリン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 mL	100 μmol/mL
Cofactor*	0.38 mL	―――
塩化カリウム	―――	33 μmol/mL
グルコース-6-リン酸	―――	5 μmol/mL
NADH	―――	4 μmol/mL
NADPH	―――	4 μmol/mL
0.4 mol/L 塩化マグネシウム溶液	0.02 mL	8 μmol/mL

NADH: Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form, disodium salt

NADPH: Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetrasodium salt

*: Cofactor は、上記の成分を混合してフィルター滅菌した後、凍結保存(設定温度:-80℃)し、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

5. 被験物質調製液の調製

被験物質は 50.0 mg/mL の濃度で水に不溶であるが DMSO には溶解するため、試験に際しては、被験物質を DMSO(ロット番号:LTQ5318、和光純薬工業)に溶解して最高用量の被験物質調製液(50.0 mg/mL)を調製し、以下同溶媒で段階希釈して速やかに試験に用いた。被験物質調製液は用時調製した。調製濃度を以下に示す。

用量設定試験:0.500、1.50、5.00、15.0、50.0 mg/mL

本試験 I、II:0.391、0.781、1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0 mg/mL

なお、被験物質調製液(原液)の調製時に、発熱、発泡および変色は認められなかった。また、調製後、すみやかに試験に供すること、および変異原性試験の特徴[GLP ガイドブック(1997)、薬事日報社]から、溶媒中での安定性および含量試験は実施しなかった。

6. 試験操作

1)試験菌液の作製

凍結保存菌を解凍後、速やかにニュートリエントブロス No. 2(ロット番号:255164、Oxoid)を 12 mL 入れた L 字型試験管に 12 μL(TA100、TA1535 および TA98)あるいは 6 μL(TA1537 および WP2 *uvrA*)接種し、4℃で保冷後、37℃で 10 時間、往復振とう培養したものを試験菌液とした。振とうには

DOUBLE SHAKER NR-3(大洋科学工業)を用い、振幅は 25 mm、振とう回数は毎分 100 回とした。試験菌液の増殖の確認のため、分光光度計(型式:UV-120-02、島津製作所)により、試験菌液の 660 nm の吸光度を測定した。また、段階希釈法により生菌数を求めた。660 nm の吸光度の測定値および生菌数を以下に示す。

試験の種類		検定菌				
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
用量設定試験	OD_{660}	1.859	1.978	1.973	1.926	1.831
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.42	3.04	3.73	2.20	1.14
本試験 I	OD_{660}	1.900	2.01	1.997	1.945	1.815
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.33	2.91	3.55	2.38	1.09
本試験 II	OD_{660}	1.900	2.00	1.976	1.943	1.826
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.70	3.12	3.51	2.30	1.05

各試験菌液の 660 nm の吸光度の測定値は、2005 年度の背景データの平均値の 90%以上であった。また、各試験菌液の生菌数は 1×10^9 cells/mL 以上であった。

2)試験法

試験は、プレインキュベーション法により、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 非存在下および哺乳動物(ラット)のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験する S9 mix 存在下で行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、S9 mix 非存在下では 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mL、S9 mix 存在下では S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、37℃で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガーを加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液の代わりに使用溶媒 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。

培養は 37℃で 48 時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー(CA-11、システムサイエンス)または目視により計測した。なお、本試験 II においては、培養終了後からコロニー計測までの 1 日間、平板培地を冷蔵(設定温度:4℃)で保管した。被験物質に由来する沈澱の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は、用量設定試験においては陰性および陽性対照では 3 枚ずつ、各

用量については 1 枚ずつとした。また、本試験においては、両対照および各用量につき 3 枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。陰性および陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

上記の方法により、用量設定試験は 1 回、本試験は 2 回実施し、結果の再現性を確認した。

3) 試験用量

用量設定試験においては、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、最高用量を 5000 μg/plate とし、50.0、150、500、1500 および 5000 μg/plate の 5 段階の用量を設定した。

本試験においては、用量設定試験の結果から、生育阻害の認められない用量が 4 用量以上得られるように、また、変異コロニー数の増加について用量依存性および最大比活性が確認できるように、最高用量をすべての検定菌で 5000 μg/plate とし、TA100 は、39.1、78.1、156、313、625、1250、2500 および 5000 μg/plate の 8 段階の用量を、TA1535 および WP2 *uvrA* は、313、625、1250、2500 および 5000 μg/plate の 5 段階の用量を、TA98 は、156、313、625、1250、2500 および 5000 μg/plate の 6 段階の用量を、TA1537 は 78.1、156、313、625、1250、2500 および 5000 μg/plate の 7 段階の用量を、それぞれ設定した。

4) 無菌試験

小試験管中に、最高用量の被験物質調製液 0.1 mL および 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mL、あるいは S9 mix 0.5 mL を入れ、37℃で 20 分間プレインキュベーションした後、2 mL のトップアガー(*Salmonella typhimurium* 用)を加えて混合し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。平板を 37℃で 48 時間培養後、本試験Ⅱにおいては 1 日間冷蔵(設定温度:4℃)で保管したのち、雑菌の混入の有無を調べた。

5) 識別法

平板側面に識別番号を記載した。S9 mix 非存在下は黒、S9 mix 存在下は赤の色で識別した。菌の識別は、TA100 は 0、TA1535 は 5、TA98 は 9、TA1537 は 7、WP2 *uvrA* は W とした。用量の識別は、菌の識別番号の右に用量の低いものから 1、2、3、・・・と記入した。陰性対照および陽性対照は、菌の識別番号の右に各々0 および P と記入して識別した。試験の識別は、通し番号(1、2、3、・・・)を設けて菌の識別番号の左に記入した。生菌数測定における平板の識別は、菌の識別番号の左に VC と記入した。無菌試験における平板の識別は、被験物質については試験の識別で設けた通し番号(1、2、

3、・・・)のみを記入し、S9 mix についてはS9と記入した。

6)背景データによる管理

陰性対照および陽性対照の結果が、背景データの変動範囲内(平均値±3×標準偏差)から外れた場合には、該当する検定菌について再度、同一用量を用いて試験を実施し、再試験のデータを採用することとした。なお、背景データは、2005 年度に実施した各試験の陰性対照値および陽性対照値とした(Appendix 3)。

7. 結果の表示

結果の表示は、各々の平板における変異コロニー数の実測値とその平均値および標準偏差を示した。また、平均値を用いて用量－反応曲線を作成した。また、被験物質に由来する沈澱および生育阻害が認められた場合は、その旨表示することとした。陽性結果が得られた検定菌に関しては、各試験で変異コロニー数が陰性対照値の2倍以上となった用量について、変異コロニー数の平均値から陰性対照値を差し引いた値を用量で除して比活性値(誘発復帰変異コロニー数/mg)を算出し、その最高値を求めた。

8. 判定

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix 非存在下あるいはS9 mix 存在下において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の 2 倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、本試験系において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判定することとした。なお、結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

試験期間中に、「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。

結果と考察

1. 用量設定試験

m-ニトロ安息香酸について、50.0、150、500、1500 および 5000 μg/plate の 5 段階の用量を設定して用量設定試験を行った(Table 1)。その結果、TA98 の S9 mix 存在下の 5000 μg/plate の用量で生育阻害が認められた。被験物質に由来する沈澱は、S9 mix 非存在下および存在下ともに認められなかった。

変異コロニー数は、TA100 および TA1537 の S9 mix 非存在下および存在下と、TA98 の S9 mix 非存在下において、陰性対照値の 2 倍以上となる増加が認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量を、すべての検定菌で 5000 μg/plate とした。

2. 本試験

最高用量を 5000 μg/plate とし、TA100 では公比 2 で 8 用量(39.1～5000 μg/plate)、TA1535 および WP2 *uvrA* では公比 2 で 5 用量(313～5000 μg/plate)、TA98 では公比 2 で 6 用量(156～5000 μg/plate)、TA1537 では公比 2 で 7 用量(78.1～5000 μg/plate)をそれぞれ設定して、2 回の本試験(本試験 I および本試験 II)を行った(Tables 2、3 および Figures 1、2)。その結果、2 回の本試験ともに、TA98 の S9 mix 存在下の 5000 μg/plate の用量で生育阻害が認められた。被験物質に由来する沈澱は、S9 mix 非存在下および存在下ともに認められなかった。

変異コロニー数は、2 回の本試験ともに、TA100 および TA1537 の S9 mix 非存在下および存在下と、TA1535 および TA98 の S9 mix 非存在下において、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められ、その増加には用量依存性および再現性が認められた。

陰性対照値の 2 倍以上となった用量について、比活性 [プレートあたりの復帰変異コロニー数から陰性対照の復帰変異コロニー数を差し引いて、当該用量(mg/plate)で除した値] を求めた(Appendix 4)。その結果、最大比活性値は 1378(TA100、S9 mix 非存在下、156 μg/plate、本試験 II)で、同条件の陽性対照値の比活性値(30700000)の約 22279 分の 1 であった。

すべての試験において、最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の遺伝子突然変異誘発性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データの変動範囲内(平均値±3×標準偏差)であったことか

ら、本試験系の有効性が確認された。

m-ニトロ安息香酸については、当研究所で実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験(試験番号:G-05-086)で、構造異常陽性の結果が得られている。

また、*m*-ニトロ安息香酸については、復帰突然変異試験で陽性の結果が報告されている[4]。関連物質である2-nitrobenzoic acidについては復帰突然変異試験で陽性、nitrobenzeneについては復帰突然変異試験で陽性の結果が報告されている[4]。Isophthalic acidについては復帰突然変異試験で陰性の結果が報告されている[5]。Terephthalic acidについては復帰突然変異試験では陰性、染色体異常試験では構造異常で疑陽性、倍数体は陰性の結果が報告されている[6]。Benzoic acidについては復帰突然変異試験では陰性、染色体異常試験では構造異常で疑陽性、倍数体は陰性の結果が報告されている[7,8]。3-メチル安息香酸については復帰突然変異試験では陰性、染色体異常試験では陽性の結果が報告されている[9]。

以上の結果に基づき、*m*-ニトロ安息香酸は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判定した。

参考文献

1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K. H., Garner, R. C. eds., Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285

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

3) Green, M. H. L.: Mutagen testing using Trp^+ reversion in *Escherichia coli*. In "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds., Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187

4) 賀田恒夫, 石館基 監修:環境変異原データ集 1, サイエンティスト社, 東京, p.298(1980)

5) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修:労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性データ集, 社団法人日本化学物質安全・情報センター, 東京, p.84

(1996)

6) 祖父尼俊雄 監修, 染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー, 東京, p.481(1999)

7) 祖父尼俊雄 監修, 染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー, 東京, p.70(1999)

8) 石館基 監修, 微生物を用いる変異原性データ集, Life-Science Information Center, 東京, p.52-53(1991)

9) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修:化学物質毒性試験報告 Vol.7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.297-322(1999)

Table 1 Cytotoxicity of 3-nitrobenzoic acid in bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean±S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	134	147	138	12	13	14	26	26	25	16	16	17	14	7	8
		(140 ± 7)			(13 ± 1)			(26 ± 1)			(16 ± 1)			(10 ± 4)		
	50.0	196			15			28			22			9		
	150	332			11			26			18			18		
	500	624			23			34			17			31		
	1500	871			24			25			38			30		
	5000	505			16			23			51			22		
S9 mix (+)	0	143	126	142	13	13	10	36	31	39	23	20	31	21	12	9
		(137 ± 10)			(12 = 2)			(35 ± 4)			(25 ± 6)			(14 ± 6)		
	50.0	209			10			39			34			13		
	150	251			14			35			21			21		
	500	424			14			33			41			18		
	1500	534			11			29			38			34		
	5000	428			10			28			12 *			20		
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF-2			SA			AF-2			AF-2			9AA		
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	439	439	415	536	564	585	112	98	116	349	382	369	324	264	254
		(431 ± 14)			(562 ± 25)			(109 ± 9)			(367 ± 17)			(281 ± 38)		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	B[a]P			2AA			2AA			B[a]P			B[a]P		
	Dose (μg / plate)	5			2			10			5			5		
	Number of colonies / plate	1231	1179	1113	312	277	282	663	567	541	294	281	276	167	136	147
		(1174 ± 59)			(290 ± 19)			(590 ± 64)			(284 ± 9)			(150 ± 16)		

Negative control, Dimethyl sulfoxide

The purity of the test substance is 99.4%.

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

*, Growth inhibition was observed.

Table 2 Mutagenicity of 3-nitrobenzoic acid in bacteria (I)

With (+) or *without* (-) S9 mix	Test substance *dose* (μg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean±S.D.)														
		Base - pair substitution type									*Frameshift type*					
		TA100			TA1535			WP2 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	114	115	121	7	13	10	22	17	24	21	28	32	10	6	7
		(117 ±		4)	(10 ±		3)	(21 ±		4)	(27 ±		6)	(8 ±		2)
	39.1	175	149	158	NT			NT			NT			NT		
		(161 ±		13)												
	78.1	234	219	198	NT			NT			NT			5	5	13
		(217 ±		18)										(8 ±		5)
	156	333	316	314	NT			NT			39	34	32	16	12	19
		(321 ±		10)							(35 ±		4)	(16 ±		4)
	313	494	432	405	24	9	13	19	17	28	39	37	37	16	12	12
		(444 ±		46)	(15 ±		8)	(21 ±		6)	(38 ±		1)	(13 ±		2)
	625	746	709	683	19	19	18	23	17	21	45	34	42	27	25	24
		(713 ±		32)	(19 ±		1)	(20 ±		3)	(40 ±		6)	(25 ±		2)
	1250	829	853	997	24	20	26	27	43	30	39	43	37	27	29	31
		(893 ±		91)	(23 ±		3)	(33 ±		9)	(40 ±		3)	(29 ±		2)
	2500	759	727	705	25	14	23	31	30	25	49	64	58	27	25	26
		(730 ±		27)	(21 ±		6)	(29 ±		3)	(57 ±		8)	(26 ±		1)
	5000	434	451	435	7	9	14	24	25	28	43	49	52	17	17	19
		(440 ±		10)	(10 ±		4)	(26 ±		2)	(48 ±		5)	(18 ±		1)
S9 mix (+)	0	129	116	106	4	5	14	32	28	32	29	24	24	7	9	17
		(117 ±		12)	(8 ±		6)	(31 ±		2)	(26 ±		3)	(11 ±		5)
	39.1	149	129	152	NT			NT			NT			NT		
		(143 ±		13)												
	78.1	169	185	176	NT			NT			NT			20	20	16
		(177 ±		8)										(19 ±		2)
	156	227	231	226	NT			NT			29	31	31	10	24	28
		(228 ±		3)							(30 ±		1)	(21 ±		9)
	313	321	287	289	7	9	10	36	32	22	29	24	29	26	27	22
		(299 ±		19)	(9 ±		2)	(30 ±		7)	(27 ±		3)	(25 ±		3)
	625	449	452	450	14	12	13	21	20	26	43	33	34	18	21	25
		(450 ±		2)	(13 ±		1)	(22 ±		3)	(37 ±		6)	(21 ±		4)
	1250	513	505	523	10	12	20	28	23	25	37	43	21	37	26	38
		(514 ±		9)	(14 ±		5)	(25 ±		3)	(34 ±		11)	(34 ±		7)
	2500	508	525	491	17	10	16	27	38	33	32	39	32	36	26	45
		(508 ±		17)	(14 ±		4)	(33 ±		6)	(34 ±		4)	(36 ±		10)
	5000	361	389	381	6	12	12	35	24	26	33 *	35 *	26 *	13	15	18
		(377 ±		14)	(10 ±		3)	(28 ±		6)	(31 ±		5)	(15 ±		3)
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF-2			SA			AF-2			AF-2			9AA		
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	459	423	422	469	500	435	82	98	105	474	482	520	345	262	194
		(435 ±		21)	(468 ±		33)	(95 ±		12)	(492 ±		25)	(267 ±		76)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	B[a]P			2AA			2AA			B[a]P			B[a]P		
	Dose (μg / plate)	5			2			10			5			5		
	Number of colonies / plate	1137	1143	1123	278	303	269	476	497	481	310	316	308	145	130	133
		(1134 ±		10)	(283 ±		18)	(485 ±		11)	(311 ±		4)	(136 ±		8)

Negative control, Dimethyl sulfoxide

The purity of the test substance is 99.4%.

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

*, Growth inhibition was observed.

NT, Not tested.

Table 3 Mutagenicity of 3-nitrobenzoic acid in bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean±S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	122	106	122	15	12	13	14	20	22	24	24	21	4	6	12
		(117 ±		9)	(13 ±		2)	(19 ±		4)	(23 ±		2)	(7 ±		4)
	39.1	197	156	165	NT			NT			NT			NT		
		(173 ±		22)												
	78.1	207	225	205	NT			NT			NT			6	10	8
		(212 ±		11)										(8 ±		2)
	156	307	346	344	NT			NT			32	25	21	16	10	13
		(332 ±		22)							(26 ±		6)	(13 ±		3)
	313	455	521	505	23	21	19	23	28	14	39	29	27	14	14	16
		(494 ±		34)	(21 ±		2)	(22 ±		7)	(32 ±		6)	(15 ±		1)
	625	659	625	614	23	25	27	25	34	30	38	49	47	19	29	22
		(633 ±		23)	(25 ±		2)	(30 ±		5)	(45 ±		6)	(23 ±		5)
	1250	804	824	787	34	27	27	20	27	28	42	33	34	35	21	33
		(805 ±		19)	(29 ±		4)	(25 ±		4)	(36 ±		5)	(30 ±		8)
	2500	680	700	740	22	24	22	35	27	20	44	48	56	27	26	30
		(707 ±		31)	(23 ±		1)	(27 ±		8)	(49 ±		6)	(28 ±		2)
	5000	416	448	440	17	23	26	39	25	31	46	47	49	28	17	25
		(435 ±		17)	(22 ±		5)	(32 ±		7)	(47 ±		2)	(23 ±		6)
S9 mix (+)	0	112	98	115	16	13	13	32	32	35	31	29	31	14	8	15
		(108 ±		9)	(14 ±		2)	(33 ±		2)	(30 ±		1)	(12 ±		4)
	39.1	148	160	136	NT			NT			NT			NT		
		(148 ±		12)												
	78.1	160	165	150	NT			NT			NT			20	27	23
		(158 ±		8)										(23 ±		4)
	156	198	233	203	NT			NT			34	30	31	28	22	22
		(211 ±		19)							(32 ±		2)	(24 ±		3)
	313	252	244	276	19	17	15	36	34	33	25	34	41	28	27	27
		(257 ±		17)	(17 ±		2)	(34 ±		2)	(33 ±		8)	(27 ±		1)
	625	376	382	362	19	14	19	30	28	36	34	32	29	38	25	40
		(373 ±		10)	(17 ±		3)	(31 ±		4)	(32 ±		3)	(34 ±		8)
	1250	426	427	443	23	24	14	33	40	37	32	36	40	41	43	37
		(432 ±		10)	(20 ±		6)	(37 ±		4)	(36 ±		4)	(40 ±		3)
	2500	466	488	473	23	21	19	29	37	42	20	22	26	40	47	35
		(476 ±		11)	(21 ±		2)	(36 ±		7)	(23 ±		3)	(41 ±		6)
	5000	387	372	382	18	13	21	36	34	20	35 *	29 *	42 *	30	26	26
		(380 ±		8)	(17 ±		4)	(30 ±		9)	(35 ±		7)	(27 ±		2)
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF-2			SA			AF-2			AF-2			9AA		
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	412	389	471	540	530	521	99	125	109	376	381	446	263	346	305
		(424 ±		42)	(530 ±		10)	(111 ±		13)	(401 ±		39)	(305 ±		42)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	B[a]P			2AA			2AA			B[a]P			B[a]P		
	Dose (μg / plate)	5			2			10			5			5		
	Number of colonies / plate	1085	1049	1075	300	296	266	679	608	613	284	285	295	125	103	152
		(1070 ±		19)	(287 ±		19)	(633 ±		40)	(288 ±		6)	(127 ±		25)

Negative control, Dimethyl sulfoxide

The purity of the test substance is 99.4%.

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

*, Growth inhibition was observed.

NT, Not tested.

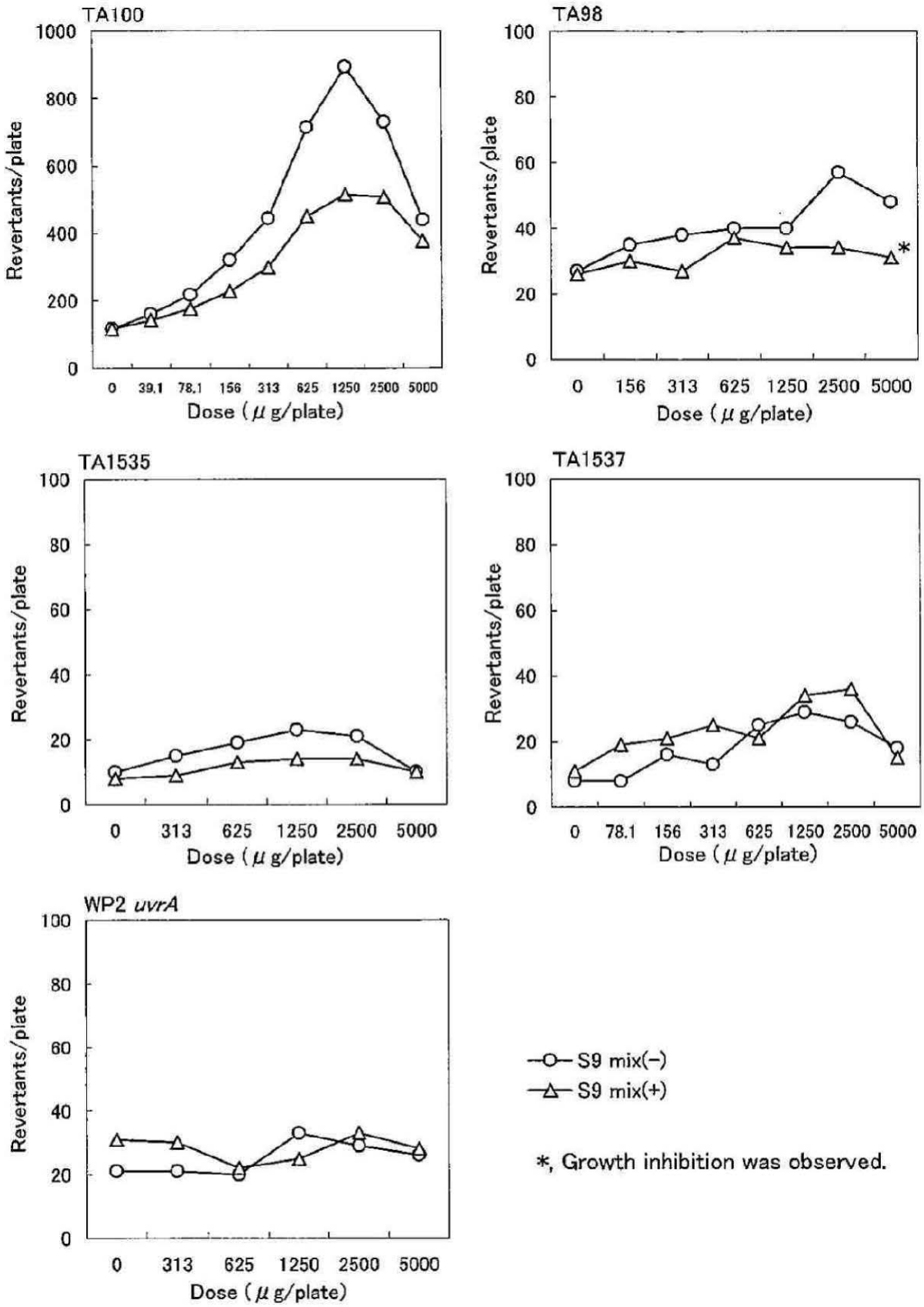

Figure 1 Dose response curves in mutagenicity test (I) of 3-nitrobenzoic acid in bacteria

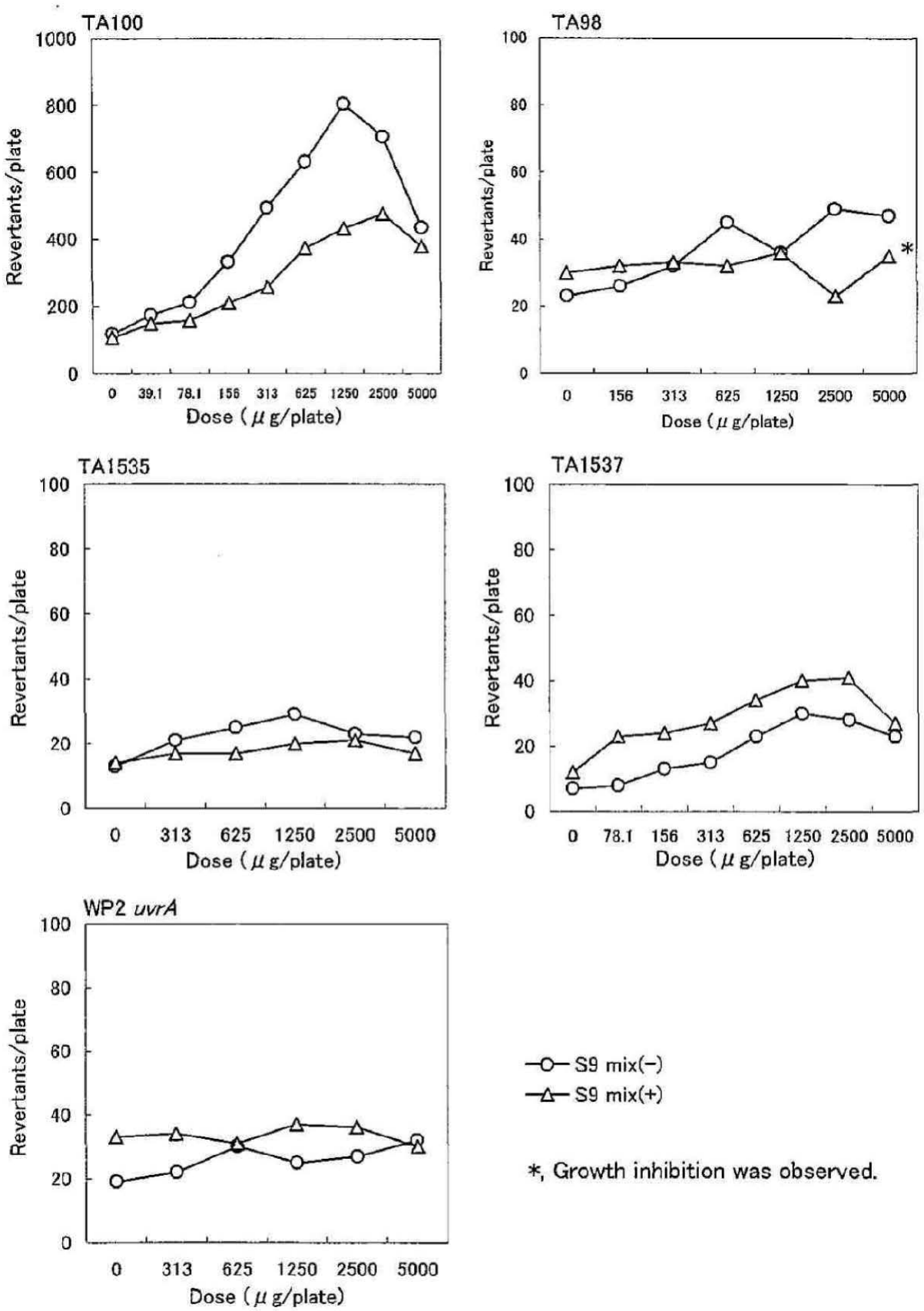

Figure 2 Dose response curves in mutagenicity test (II) of 3-nitrobenzoic acid in bacteria