



N-(1, 3-ジメチルブチル)-*N'*-フェニル-*α*-フェニレンジアミン
の細菌を用いる
復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	2
材料および方法	3
結果および考察	6
結 論	7
特 記 事 項	7
文 献	7
Tables 1~4	

【要 約】

N-(1,3-ジメチルブチル)-*N'*-フェニル-*p*-フェニレンジアミンの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、WP2 *uvrA* 以外の検定菌で強い抗菌性が認められた。*Salmonella* の4菌株はS9 mix 無添加試験において、すべての用量で抗菌性が認められたため、0.500~50.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で再度用量設定試験を行った。これらの結果に基づき、本試験では最高用量をS9 mix 無添加試験ではWP2 *uvrA* で5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA100とTA98では78.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1535とTA1537では19.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、またS9 mix 添加試験ではWP2 *uvrA* では5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98では625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、その他の検定菌では156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として、5~6用量を設定して本試験を実施した。

その結果、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかったことから、*N*-(1,3-ジメチルブチル)-*N'*-フェニル-*p*-フェニレンジアミンは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【緒 言】

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、*N*-(1,3-ジメチルブチル)-*N'*-フェニル-*p*-フェニレンジアミンについて、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。

この試験は、サルモネラ菌（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異²⁾、ならびに大腸菌における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⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験と、哺乳動物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変異原性を試験する S9 mix 添加試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号、一部改正平成9年10月31日、環保安第287号、衛生第127号、平成09・10・31基局第2号）および「OECD毒性試験ガイドライン：471」に準拠し、「化学物質GLP基準」（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、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

【材料および方法】

〔検 定 菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium 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 から分与された。

検定菌は -80°C 以下で凍結保存したものを用いた。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*) およびアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Oxoid Ltd.) を入れたL字型試験管に解凍した菌液を一定量加え、 37°C で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。試験に用いた検定菌液の生菌数を Appendix 1 に示した。

〔被 験 物 質〕

N-(1,3-ジメチルブチル)-N'-フェニル-p-フェニレンジアミン (略称: DPPD、CAS No. 793-24-8) は、分子量 268.40 の暗紫褐色粒状固体である。構造式等は Appendix 2 に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99wt% (不純物: N-Phenyl-1,4-benzenediamine) であり、 から供与された。被験物質は、使用時まで密封して冷蔵、遮光して保管した。

DPPDは、ジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業(株)、ロット番号: TPJ5678) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 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) ロット番号 WTQ0059, 純度98%以上)
SA : アツ化ナトリウム (和光純薬工業(株) ロット番号 DLL3931, 純度98%以上)
9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co. ロット番号 106F06681, 純度97%以上)
2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株) ロット番号 DLH6052, 純度90%以上)

AF2、9AA および 2AA は DMSO に、SA は超純水に溶解したものを -20°C で凍結保存し、解凍後速やかに試験に用いた。

[培地および S9 mix の組成]

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクテガ- (Difco Lab.)	0.6 %	(B)* L-ヒスチン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5 %	D-ビオチン	0.5 mM

* : WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号: HY2802、1997年10月16日製造、および HY2901、1997年11月21日製造) を用いた。なお、培地 1L あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g	水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カルシウム	10 g	大洋寒天 (清水食品)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g		

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。

3) S9 mix (1 mL 中下記の成分を含む)

S9**	0.1 mL	NADH	4 μ mol
塩化マグネシウム	8 μ mol	NADPH	4 μ mol
塩化カルシウム	33 μ mol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol		

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットにフェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与を行い、酵素誘導して作製したS9 (キッコーマン(株)、ロット番号: RAA-370、1997年10月3日製造および RAA-376、1998年1月23日製造) を購入し、 -80°C で凍結保存し、用時に解凍して用いた。PB および BF の投与量は 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 で、いずれも腹腔内投与したものである。肝臓の摘出および S9 の調製は 5日目。

〔試験方法〕

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、リン酸緩衝液 0.5 mL (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 mL)、検定菌液 0.1 mL を混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、トッパアガー 2 mL を加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒または陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。同時に実施した試験については、溶媒および陽性対照群を共通とした。培養は37°Cで48時間行い、発生した変異コロニー数を目視またはコロニーカウンターを用いて算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜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、溶媒および陽性対照群では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、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は2回、また本試験は同一用量について2回実施し、結果の再現性の確認を行った。また、最高用量の被験物質 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ最少グルコース寒天培地上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

〔判定基準〕

結果の判定に統計学的手法は用いないこととした。

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、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、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する（陽性）と判定することとした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

DPPDについて 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3として、試験を実施した (Table 1)。その結果、S9 mix 無添加試験においては、TA100、TA1535、TA98 および TA1537 ではすべての用量で抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA* では抗菌性は認められなかった。

また、S9 mix 添加試験においては、TA100、TA1535 および TA1537 では 150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、TA98 では 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA* では抗菌性は認められなかった。

S9 mix 無添加試験の *Salmonella* の4菌株においては、すべての用量で抗菌性が認められたため、0.500~50.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で再度用量設定試験を実施した (Table 2)。その結果、TA1535 と TA1537 では 15.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、TA100 と TA98 では 50.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験については、WP2 *uvrA* では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA100 と TA98 では 78.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1535 と TA1537 では 19.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。また、S9 mix 添加試験では、WP2 *uvrA* では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 では 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA100、TA1535 および TA1537 では 156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

上記の最高用量に基づいて、公比2で5~6用量を設定して2回の本試験を実施した (Table 3、4)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められず、陰性であった。

一方、DPPDは、当研究所で本試験と並行して実施されたチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では、S9 mix 非存在下において染色体の構造異常が誘発され、陽性であった (食薬セ研第9-1946号)。DPPDの類縁化合物については、簡単な情報検索を行ったが、変異原性に関する情報は得られなかった。

DPPDについて実施したすべての試験において、用いた最高用量の調製液およびS9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験では、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、溶媒対照値とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験系の有効性が確認された。

【結 論】

以上の結果に基づき、*N*-(1,3-ジメチルブチル)-*N'*-フェニル-*o*-フェニレンジアミンは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【特 記 事 項】

試験の全過程を通して、試験の信頼性に影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態、および試験計画書からの逸脱はなかった。

【文 献】

- 1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: 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.: Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 3) Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360

Table 1. Cytotoxicity of *N*-(1,3-dimethylbutyl)-*N'*-phenyl-*p*-phenylenediamine on 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 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	128	118	128	8	10	9	15	26	20	20	23	23	12	10	9	
		(125 ± 5.8)			(9 ± 1.0)			(20 ± 5.5)			(22 ± 1.7)			(10 ± 1.5)			
	50.0	149 *			2 *			21			14 *			0 *			
	150	104 *			7 *			12			14 *			0 *			
	500 †	84 *			0 *			20			10 *			0 *			
	1500 †	68 *			0 *			8			3 *			0 *			
	5000 †	62 *			0 *			12			0 *			0 *			
S9 mix (+)	0	102	103	110	11	8	12	31	30	33	48	34	31	16	14	17	
		(105 ± 4.4)			(10 ± 2.1)			(31 ± 1.5)			(38 ± 9.1)			(16 ± 1.5)			
	50.0	131			13			34			31			7			
	150	140 *			9 *			35			23			1 *			
	500	25 *			3 *			15			22 *			0 *			
	1500	0 *			3 *			11			3 *			0 *			
	5000 †	0 *			1 *			15			2 *			0 *			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1063	989	956	384	371	363	734	695	660	488	435	482	200	267	274	
		(1003 ± 54.8)			(373 ± 10.6)			(696 ± 37.0)			(468 ± 29.0)			(247 ± 40.9)			

Purity was 99wt% and *N*-phenyl-1,4-benzenediamine was contained as impurity .

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. †: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Table 2. Cytotoxicity of *N*-(1,3-dimethylbutyl)-*N'*-phenyl-*p*-phenylenediamine on 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			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	116	131	127	8	11	8	26	20	19	7	7	6	
		(125 ± 7.8)			(9 ± 1.7)			(22 ± 3.8)			(7 ± 0.6)			
	0.500	155			9			29			4			
	1.50	160			9			23			8			
	5.00	126			14			14			9			
	15.0	121			5 *			18			5 *			
	50.0	111 *			7 *			4 *			0 *			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	531	569	548	566	654	355	619	601	605	323	400	342	
		(549 ± 19.0)			(525 ± 153.7)			(608 ± 9.5)			(355 ± 40.1)			
Positive control														
S9 mix (+)														

Purity was 99wt% and *N*-phenyl-1,4-benzenediamine was contained as impurity .
 AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine
 *: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Table 3-1. Mutagenicity of *N*-(1,3-dimethylbutyl)-*N'*-phenyl-*p*-phenylenediamine on 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			TA98			TA1537						
S9 mix (-)	0	109	142	126	12	14	18	16	15	16	8	17	11	(126 ± 16.5)	(15 ± 3.1)	(16 ± 0.6)	(12 ± 4.6)
	0.61	ND				7	8	16	ND				6	4	8	(10 ± 4.9)	(6 ± 2.0)
	1.22	ND				14	13	11	ND				7	5	12	(13 ± 1.5)	(8 ± 3.6)
	2.44	148	151	123	20	14	10	12	21	19	8	12	5	(141 ± 15.4)	(15 ± 5.0)	(17 ± 4.7)	(8 ± 3.5)
	4.88	133	144	125	16	6	8	21	22	19	10	7	8	(134 ± 9.5)	(10 ± 5.3)	(21 ± 1.5)	(8 ± 1.5)
	9.77	124	123	111	10 *	8 *	8 *	15	13	11	3 *	4 *	4 *	(119 ± 7.2)	(9 ± 1.2)	(13 ± 2.0)	(4 ± 0.6)
	19.5	101	119	108	4 *	2 *	7 *	10	10	5	0 *	0 *	0 *	(109 ± 9.1)	(4 ± 2.5)	(8 ± 2.9)	(0 ± 0.0)
	39.1	118 *	106 *	107 *	ND			10 *	18 *	9 *	ND			(110 ± 6.7)	ND	(12 ± 4.9)	ND
	78.1	104 *	117 *	93 *	ND			12 *	7 *	3 *	ND			(105 ± 12.0)	ND	(7 ± 4.5)	ND
S9 mix (+)	0	126	179	150	10	17	12	38	35	26	8	18	19	(152 ± 26.5)	(13 ± 3.6)	(33 ± 6.2)	(15 ± 6.1)
	4.88	181	143	171	14	11	14	ND			12	20	12	(165 ± 19.7)	(13 ± 1.7)	ND	(15 ± 4.6)
	9.77	190	169	173	9	11	13	ND			14	10	12	(177 ± 11.2)	(11 ± 2.0)	ND	(12 ± 2.0)
	19.5	192	198	193	10	9	9	37	28	41	19	10	11	(194 ± 3.2)	(9 ± 0.6)	(35 ± 6.7)	(13 ± 4.9)
	39.1	175	183	195	14	6	15	24	30	29	11	13	14	(184 ± 10.1)	(12 ± 4.9)	(28 ± 3.2)	(13 ± 1.5)
	78.1	169	171	180	14	7	12	13	32	34	6 *	9 *	9 *	(173 ± 5.9)	(11 ± 3.6)	(26 ± 11.6)	(8 ± 1.7)
	156	155 *	148 *	141 *	10 *	6 *	7 *	25	18	16	1 *	0 *	0 *	(148 ± 7.0)	(8 ± 2.1)	(20 ± 4.7)	(0 ± 0.6)
	313	ND			ND			22	20	19	ND			ND		(20 ± 1.5)	ND
	625	ND			ND			4 *	15 *	7 *	ND			ND		(9 ± 5.7)	ND
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			9AA						
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.1			80						
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA						
	Dose (µg /plate)	1			2			0.5			2						
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	541	563	551	620	614	575	539	538	604	398	314	588	(552 ± 11.0)	(603 ± 24.4)	(560 ± 37.8)	(433 ± 140.4)
	Number of colonies / plate	1327	1123	1120	389	399	423	508	425	485	313	361	329	(1190 ± 118.7)	(404 ± 17.5)	(473 ± 42.9)	(334 ± 24.4)

Purity was 99wt% and *N*-phenyl-1,4-benzenediamine was contained as impurity .

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

ND : Not done

Table 3-2. Mutagenicity of *N*-(1,3-dimethylbutyl)-*N'*-phenyl-*p*-phenylenediamine on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean \pm S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
				WP2 <i>uvrA</i>			
S9 mix (-)	0			10 13 13 (12 \pm 1.7)			
	313 †			19 15 11 (15 \pm 4.0)			
	625 †			8 14 14 (12 \pm 3.5)			
	1250 †			12 13 7 (11 \pm 3.2)			
	2500 †			7 11 11 (10 \pm 2.3)			
	5000 †			12 7 7 (9 \pm 2.9)			
S9 mix (+)	0			23 20 25 (23 \pm 2.5)			
	313			9 12 14 (12 \pm 2.5)			
	625			17 13 6 (12 \pm 5.6)			
	1250			14 9 10 (11 \pm 2.6)			
	2500			10 11 3 (8 \pm 4.4)			
	5000 †			4 7 6 (6 \pm 1.5)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (μg /plate)			0.01			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose (μg /plate)			10			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate			182 157 170 (170 \pm 12.5)			
	Number of colonies / plate			724 663 690 (692 \pm 30.6)			

Purity was 99wt% and *N*-phenyl-1,4-benzenediamine was contained as impurity .

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA: 2-Aminoanthracene

†: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Table 4-1. Mutagenicity of *N*-(1,3-dimethylbutyl)-*N'*-phenyl-*p*-phenylenediamine on 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			TA98			TA1537						
S9 mix (-)	0	125	146	125	12	10	13	14	14	21	7	10	12	(132 ± 12.1)	(12 ± 1.5)	(16 ± 4.0)	(10 ± 2.5)
	0.61	ND			11	11	9	ND			7	11	10	(10 ± 1.2)			(9 ± 2.1)
	1.22	ND			10	16	4	ND			5	10	10	(10 ± 6.0)			(8 ± 2.9)
	2.44	141	156	162	12	9	6	20	18	19	7	12	7	(153 ± 10.8)	(9 ± 3.0)	(19 ± 1.0)	(9 ± 2.9)
	4.88	140	141	156	10	8	7	13	18	14	3	6	7	(146 ± 9.0)	(8 ± 1.5)	(15 ± 2.6)	(5 ± 2.1)
	9.77	148	154	151	8	6	8	17	26	16	9	9	4	(151 ± 3.0)	(7 ± 1.2)	(20 ± 5.5)	(7 ± 2.9)
	19.5	128	129	110	7 *	2 *	6 *	12	15	11	1 *	1 *	2 *	(122 ± 10.7)	(5 ± 2.6)	(13 ± 2.1)	(1 ± 0.6)
	39.1	111 *	149 *	143 *	ND			11	14	11	ND			(134 ± 20.4)		(12 ± 1.7)	
	78.1	135 *	128 *	116 *	ND			12 *	16 *	15 *	ND			(126 ± 9.6)		(14 ± 2.1)	
S9 mix (+)	0	167	165	167	16	10	14	43	33	30	15	17	15	(166 ± 1.2)	(13 ± 3.1)	(35 ± 6.8)	(16 ± 1.2)
	4.88	198	171	176	13	8	9	ND			9	12	18	(182 ± 14.4)	(10 ± 2.6)		(13 ± 4.6)
	9.77	179	167	189	11	12	12	ND			11	19	18	(178 ± 11.0)	(12 ± 0.6)		(16 ± 4.4)
	19.5	165	163	189	8	5	14	26	35	33	17	18	20	(172 ± 14.5)	(9 ± 4.6)	(31 ± 4.7)	(18 ± 1.5)
	39.1	192	214	190	13	10	11	34	34	39	9	16	15	(199 ± 13.3)	(11 ± 1.5)	(36 ± 2.9)	(13 ± 3.8)
	78.1	167	169	201	10	17	18	20	27	32	13 *	10 *	9 *	(179 ± 19.1)	(15 ± 4.4)	(26 ± 6.0)	(11 ± 2.1)
	156	127 *	126 *	150 *	9 *	9 *	17 *	26	16	23	1 *	1 *	6 *	(134 ± 13.6)	(12 ± 4.6)	(22 ± 5.1)	(3 ± 2.9)
	313	ND			ND			17	15	18	ND					(17 ± 1.5)	
	625	ND			ND			12 *	13 *	7 *	ND					(11 ± 3.2)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			9AA						
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.1			80						
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA						
	Dose (µg /plate)	1			2			0.5			2						
	Number of colonies / plate	492	525	468	597	629	644	542	574	511	468	389	356	(495 ± 28.6)	(623 ± 24.0)	(542 ± 31.5)	(404 ± 57.6)
	Number of colonies / plate	930	932	968	365	398	508	466	401	366	349	348	502	(943 ± 21.4)	(424 ± 74.9)	(411 ± 50.7)	(400 ± 88.6)

Purity was 99wt% and *N*-phenyl-1,4-benzenediamine was contained as impurity .

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

ND : Not done

Table 4-2. Mutagenicity of *N*-(1,3-dimethylbutyl)-*N'*-phenyl-*p*-phenylenediamine on 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		
				WP2 <i>uvrA</i>			
S9 mix (-)	0			30 25 23 (26 ± 3.6)			
	313 †			21 17 13 (17 ± 4.0)			
	625 †			10 21 18 (16 ± 5.7)			
	1250 †			18 14 7 (13 ± 5.6)			
	2500 †			9 5 6 (7 ± 2.1)			
	5000 †			7 3 7 (6 ± 2.3)			
S9 mix (+)	0			23 26 32 (27 ± 4.6)			
	313			21 24 13 (19 ± 5.7)			
	625			15 21 10 (15 ± 5.5)			
	1250			12 10 10 (11 ± 1.2)			
	2500			8 8 4 (7 ± 2.3)			
	5000 †			12 7 11 (10 ± 2.6)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (µg /plate)			0.01			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose (µg /plate)			10			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate			203 188 174 (188 ± 14.5)			
	Number of colonies / plate			615 580 704 (633 ± 63.9)			

Purity was 99wt% and *N*-phenyl-1,4-benzenediamine was contained as impurity .

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA: 2-Aminoanthracene

†: Precipitate was observed on the surface of agar plates.