

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレ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：2463（115-030）

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目 次

1.	要 約	1 頁
2.	試 験 題 目	2
3.	試 験 目 的	2
4.	試 験 番 号	2
9.	被 験 物 質	3
10.	試 験 材 料 及 び 方 法	4
11.	試 験 結 果	10
12.	考 察 及 び 結 論	12
13.	参 考 と し た 資 料	13
Figures, Tables 及び Appendices		
Figure 1	Bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in strain TA100	15
Figure 2	Bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in strain TA1535	16
Figure 3	Bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in strain WP2 <i>uvrA</i>	17
Figure 4	Bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in strain TA98	18
Figure 5	Bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in strain TA1537	19
Table 1	Results of the bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (1st trial) [direct method : -S9]	20
Table 2	Results of the bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (1st trial) [activation method : +S9]	21
Table 3	Results of the bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (2nd trial) [direct method : -S9]	22
Table 4	Results of the bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (2nd trial) [activation method : +S9]	23

1. 要 約：

本試験条件下において、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレ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。

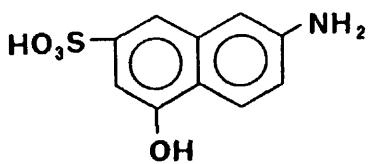
すなわち、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸の変異原性について、遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、TA98、TA1535及び TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

あらかじめ予備的な試験を実施し、本試験の用量を設定した。その結果、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸処理の場合、代謝活性化法のネズミチフス菌4菌株で用量相関反応を伴った復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められた。特に TA98 では、溶媒対照の値に比較しておよそ90倍の増加を示した。直接法の場合、いずれの試験菌株においても復帰突然変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった。

一方、直接法及び代謝活性化法での陽性対照物質は、すべて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： 7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレ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： 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」及びOECD化学品テストガイドライン 471、
472（1983年）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」及びOECDのGLP（1982年）の基準を満たすものとし
た。
4. 試験番号： 2463（115-030）

9. 被 験 物 質：

- | | |
|---------------------------|---|
| 1) 被験物質名 | 7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸 |
| 2) ロット番号 | |
| 3) 純 度 | 91.8% |
| 4) 不 純 物 | 水分：3.5 wt%，硫酸ナトリウム分：2.0 wt% |
| 5) 提 供 先 | |
| 6) 保管条件 | 室温 |
| 7) 一 般 名 | J 酸 |
| 8) 化 学 名 | 7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸 |
| 9) 化学構造 |  |
| 10) 分 子 式 | $C_{10}H_9NO_4S$ |
| 11) 分 子 量 | 239.26 |
| 12) CAS No. | 87-02-5 |
| 13) 物質の状態 | 粉末 |
| 14) 溶 解 性 | 水、アセトンにほとんど不溶 |
| 15) 安 定 性 | ほぼ安定 |
| 16) 被験物質保管及び
残余被験物質の処理 | 試験終了後、残りの被験物質は染色体異常試験に使用した。 |

10. 試験材料及び方法：

1) 試験菌株

次の5種類の菌株を用いた。

- | | | | |
|----|---------|-----------------|---------------------|
| 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、
大腸菌は昭和58年3月16日に から分与を受けた。平成6年9月5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。

各菌株の菌懸濁液 80 容量に対し、ジメチルスルホキシド (DMSO : GC用 ; MERCK 社、独国 ;
純度99.7%以上、Lot No. 217 K15102078) 7容量の割合で加えて混合した後、小試料
チューブ (NUNC社、デンマーク) に 0.2 ml ずつ分注した。液体窒素 (LN₂) 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、大阪府守口市) に
-80℃で保存した。

2) 培地の調製

a. 最少グルコース寒天平板培地 (プレート)

試験には日清製粉株式会社 (東京都中央区) から購入したプレート (テスメディア AN 培
地) を用いた。本プレートは、下記の組成の溶液 (Vogel-Bonner最少培地等) をそれぞれ
高圧蒸気滅菌した後、γ線滅菌シャーレに 30 ml ずつ無菌的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2カリウム・無水塩	10	g
リン酸1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

グルコース	20	g
精製水	100	ml

寒天 (Agar No. 1)	15	g
精製水	700	ml

ロット番号及び製造日等は、添付書類によると以下のとおりである。

- (1) 培地のロット番号： AN410IJ
- (2) 培地の製造日： 平成6年9月8日
- (3) 寒天の製造元： OXOID社、英国
- (4) 寒天のロット番号： 77083

b. トップアガー

寒天 (Bacto-agar: DIFCO 社、米国; Lot No. 12528) 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滅菌した後、室温で保存した。使用時に加温溶解し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、あらかじめメンブレンフィルター (φ 0.22 μm: 岩城硝子株式会社、東京都千代田区) を用いて濾過除菌しておいた 0.5 mM L-ヒスチジン (関東化学株式会社、東京都中央区; Lot No. 210N1018) - 0.5 mM D-ビオチン (関東化学株式会社、Lot No. 603E1730) 水溶液を 1/10容量加え、45℃に保温した。一方、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. 904R6524) 水溶液を 1/10容量加え、同様に45℃に保温した。

3) 試験菌株の前培養

試験菌株の前培養には 2.5%ニュートリエントブロス (OXOID 社: No. 2; Lot No. 19947080) 水溶液を使用した。内容量 200 ml の円筒容器に本培養液を 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 μl接種した。培養開始までの間4℃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、埼玉県越谷市) を用い、37℃で8時間振盪 (往復振盪: 120回/分) 培養した。培養終了後に光電分光光度計 (UV50-201: 株式会社日立製作所、東京都千代田区) を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試 験	生 菌 数 (×10 ⁹ /ml)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
本試験 (1回目)	3.85	5.27	4.74	4.12	2.07
本試験 (2回目)	4.46	4.91	4.76	3.93	1.91

菌懸濁液については使用時まで室温で保存した。

4) S9 mix

キッコーマン株式会社（千葉県野田市）からS9 mix (Lot No. FSM-313) を購入し、使用時まで超低温フリーザー（-80℃）に保存した。製造後6カ月以内のS9 mixを使用した。

ロット番号、誘導物質及び誘導方法等は、添付書類によると以下のとおりである。

a. ロット番号	RAA-313
b. 調製日	平成6年7月22日
c. 使用動物	ラット：Sprague-Dawley系
d. 性／週齢	雄／7週齢
e. 体重	196～229g
f. 誘導物質	Phenobarbital (PB) & 5,6-Benzoflavone (BF)
g. 投与量 及び回数	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）
h. 投与方法	腹腔内投与
i. 蛋白含量	25.5 mg/ml

また、S9 mixの組成を以下に示す。

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
精製水	残量

5) 被験物質溶液の調製

DMSO (Lot No. 217 K15102078 及び 309 K18572778) に被験物質を溶解させ調製原液とした。調製原液を所定濃度に希釈した後、ただちに処理を行った。なお、本被験物質の純度が95%未満であるため、純度換算を実施したうえで調製を実施した。

6) 試験用量

あらかじめ1枚のプレートを用いて実施した予備的な試験の結果を以下に示す。

試験用量 (μg /プレート)	S 9 m i x	復帰突然変異コロニー数				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
0	-	90	7	20	18	5
8.00	-	99	8	22	18	4
40.0	-	100	8	19	24	6
200	-	83	12	15	25	7
1,000	-	96	8	21	26	6
5,000	-	118	7	23	30	20
0	+	105	10	21	35	11
8.00	+	95	10	15	25	18
40.0	+	94	3	21	25	17
200	+	100	12	29	25	21
1,000	+	94	7	25	29	22
5,000	+	1435	63	50	2329	463

本結果を基に、各菌株それぞれ 156~5,000 μg /プレートの6用量(公比2)を設定した。

7) 対照試験

a. 溶媒対照

溶媒対照として、使用溶媒のDMSO (Lot No. 217 K15102078 及び 309 K18572778) を用いた。

b. 陽性対照

DMSO (Lot No. 217 K15102078) を用いて陽性対照物質を溶解し、調製後は少量ずつに分注して凍結保存 (-20°C) した。各菌株について、下記に示した用量で試験した。なお、試験用量の設定は、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—テストガイドラインとGLP」に準じた。

《直接法》	菌 株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	AF-2	0.01 µg/プレート
ネズミチフス菌	TA98	AF-2	0.1 "
ネズミチフス菌	TA1535	NaN ₃	0.5 "
ネズミチフス菌	TA1537	ACR	80.0 "
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	1.0 µg/プレート
ネズミチフス菌	TA98	2-AA	0.5 "
ネズミチフス菌	TA1535	2-AA	2.0 "
ネズミチフス菌	TA1537	2-AA	2.0 "
大 腸 菌	WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	10.0 "

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、大阪府大阪市；純度98.0~102.0%、Lot No. SAJ0748)

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 (ALDRICH 社、米国；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) 及び S9 mix について無菌試験を実施した。すなわち、0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液 500 µl に調製原液 100 µl を加えたもの、あるいは 500 µl の S9 mix に、予め 45°C で保温しておいたトッパアガー溶液 2 ml を加え、プレート上に注いだ後、軽く回転しながら一様に広げた。37°C、48時間の培養後、雑菌汚染の有無を確認した。本無菌試験は試験毎に実施し、調製原液及び S9 mix のいずれについても 1 枚のプレートを用いた。

8) 被験物質あるいは対照物質の処理及び培養時間

滅菌済み小試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μ l、次いで 0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500 μ l (直接法の場合)、あるいは S9 mix を 500 μ l (代謝活性化法の場合) を入れた。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 μ l を加え、ウォーターバスシェーカーを用い 37°C で 20 分間振盪培養 (プレインキュベーション) した。トップアガー 2 ml を加え、注意しながら混合した後、内容物をプレート上に注ぎ一様に広げた。重層した軟寒天が固化した後、プレートを上下転倒し恒温器を用いて、37°C の条件で 48 時間培養を続けた。

独立して試験を 2 回繰り返して実施した。

9) プレート数及び識別

用量当たりそれぞれ 3 枚のプレートを使用した。

油性ペンで番号等を明記することにより、各プレートを識別した。

10) コロニー数の測定

被験物質の抗菌作用を確認するため、実体顕微鏡 ($\times 60$) を用いてプレート上の試験菌株の生育阻害について調べた。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際しては自動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、東京都福生市) 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。

11) 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。

12) 比変異活性の算出

陽性結果を示した菌株について、用量ごとに次式により mg あたりの誘発復帰突然変異コロニー数を求めた。各菌株の各試験系のうち、もっとも高い値を比変異活性値とした。

$$\text{比変異活性} = \frac{\text{当該試験用量のコロニー数} - \text{溶媒対照のコロニー数}}{\text{当該試験用量 (mg/プレート)}}$$

11. 試験結果：

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸調製溶液ならびにS9 mixの無菌試験において、菌の増殖（雑菌汚染）は認められなかった。

1) 本試験（1回目）

各用量における復帰突然変異コロニー数を Figure 1～5 及び Table 1～2 に示した。7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸処理による試験菌株に対する生育阻害作用はいずれの試験菌株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、代謝活性化法の TA100、TA1535、TA98ならびに TA1537 において用量反応相関性を伴った増加傾向が観察され、TA98では溶媒対照の値と比較して91倍程度の上昇であった。また、大腸菌では最高用量の5,000 µg/プレートでコロニー数の僅かな増加傾向が見られたが、溶媒対照の2倍を越えることはなかった。一方、直接法では溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。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。

リン酸緩衝液あるいはS9 mix添加時には特筆すべき変化は観察されなかったが、コロニー数計測時には直接法ならびに代謝活性化法の625 µg/プレート以上においてプレートが用量依存的に淡褐色を示していた。

2) 本試験（2回目）

各用量における復帰突然変異コロニー数を Figure 1～5 及び Table 3～4 に示した。7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸処理による生育阻害作用は、いずれの菌株においても認められなかった。

復帰突然変異により生じたコロニー数はネズミチフス菌（4菌株）において明確な増加傾向を示し、TA98の場合溶媒対照の84倍程度であった。また、溶媒対照値の2倍を越えることはなかったが、大腸菌においても僅かに増加する傾向が見られた。

陽性対照物質は各検定菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。

リン酸緩衝液あるいはS9 mix添加時に特筆すべき変化は観察されなかったが、コロニー数計測時には直接法ならびに代謝活性化法の625 µg/プレート以上においてプレートの色が淡褐色に変化していた。

以上2回の試験において、直接法及び代謝活性化法の両試験とも再現性が確認された。

また、変異原性の強さに関する相対的比較値である比変異活性は、以下のように算出された。

試 験	S 9	菌 株	試験用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	比変異活性 (mg当たり)
本 試 験 (1回目)	+	TA100	2,500	317
	+	TA1535	2,500	13.9
	+	TA98	5,000	498
	+	TA1537	5,000	91.5
本 試 験 (2回目)	+	TA100	2,500	321
	+	TA1535	1,250	17.6
	+	TA98	5,000	480
	+	TA1537	5,000	106

12. 考察及び結論：

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレ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5,000 µg/プレートまで検討した。その結果、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸処理群の代謝活性化法において、ネズミチフス菌での復帰突然変異コロニー数が溶媒対照の値に比較して用量相関的に増加する傾向が認められ、再現性も確認されたことから陽性反応と判断した。

また、変異原性の強さに関する相対的比較値である比変異活性は498であることから、既知変異原性物質に比較して7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸の変異活性は中等度であることを示していた。

一方、陽性対照群あるいは溶媒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、本試験が有効であることを示していた。

以上の試験結果から、本試験条件下において7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレ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。

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, Mut. Res., 31, 347 ~ 364, 1975.
- 矢作多貴江： 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.

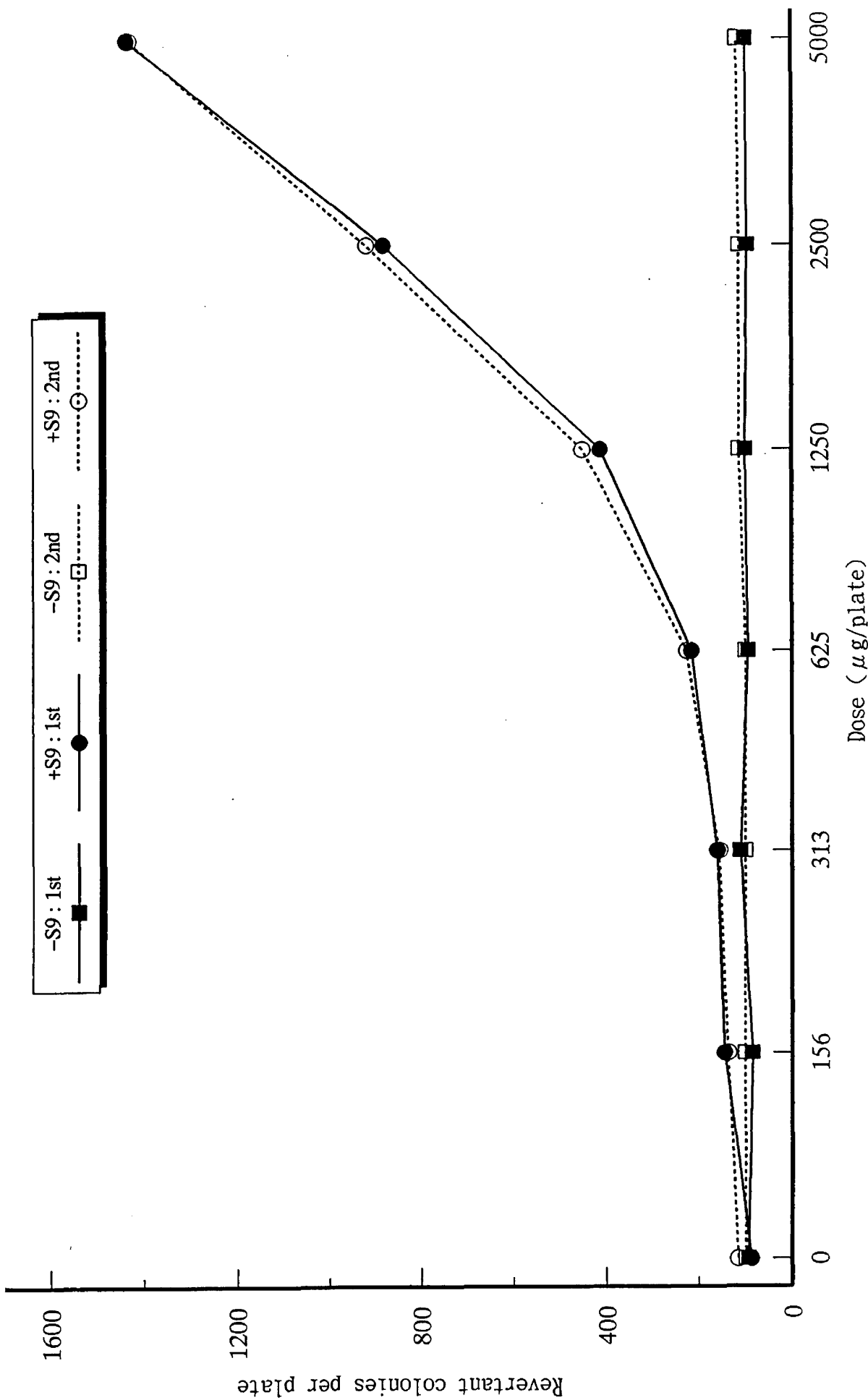


Figure 1. Bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in strain TA100

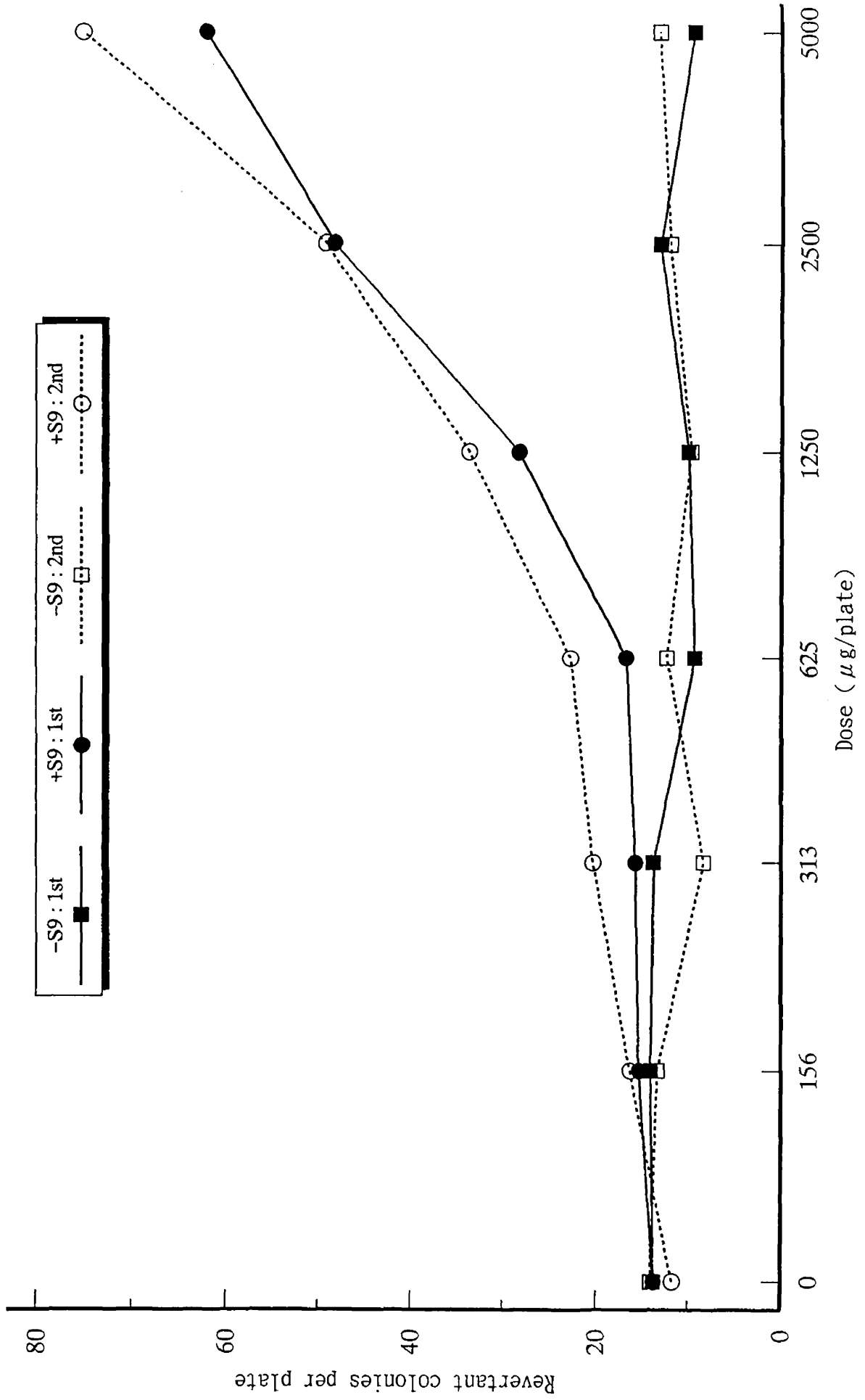


Figure 2. Bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in strain TA1535

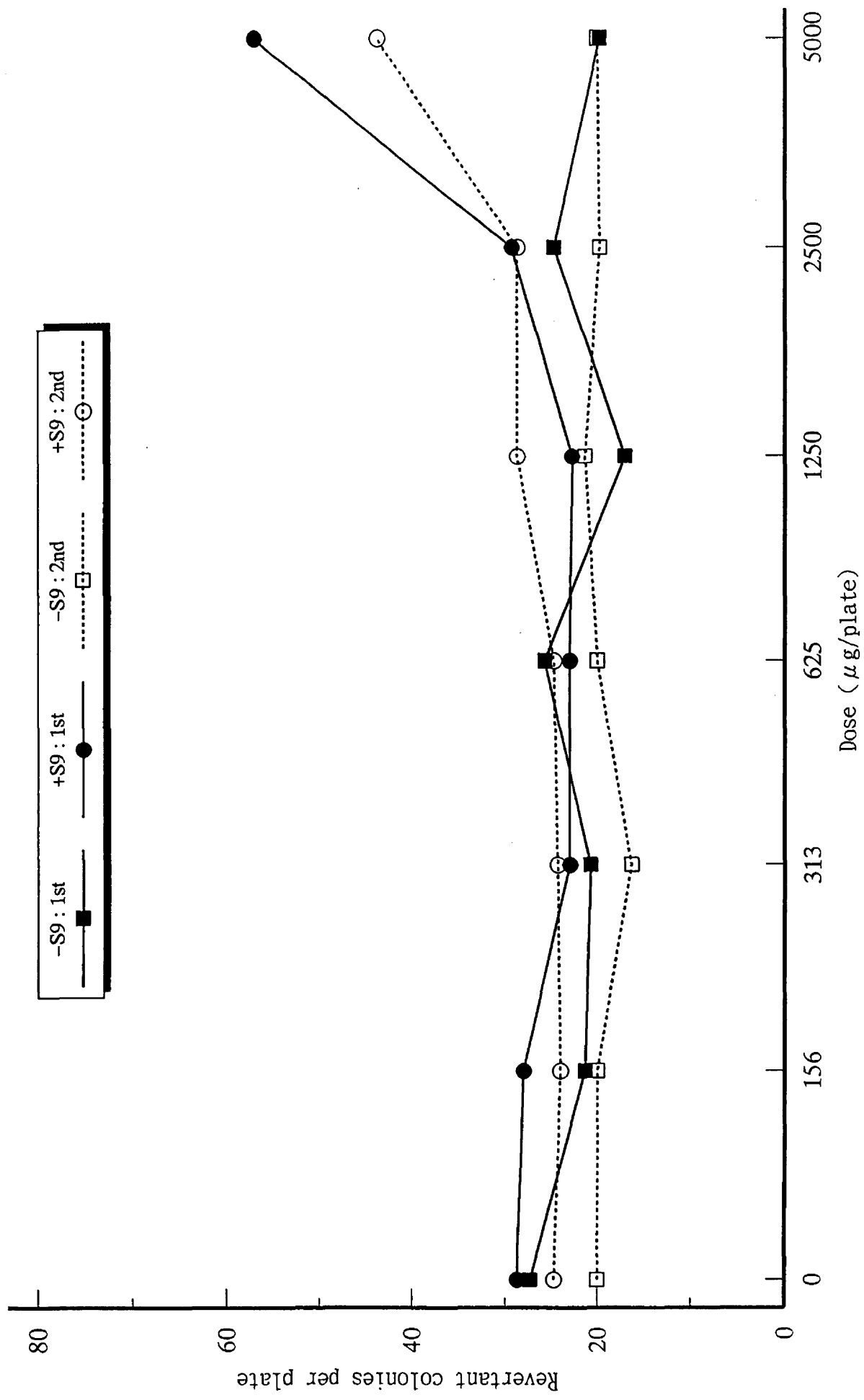


Figure 3. Bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in strain WP2 *uvrA*

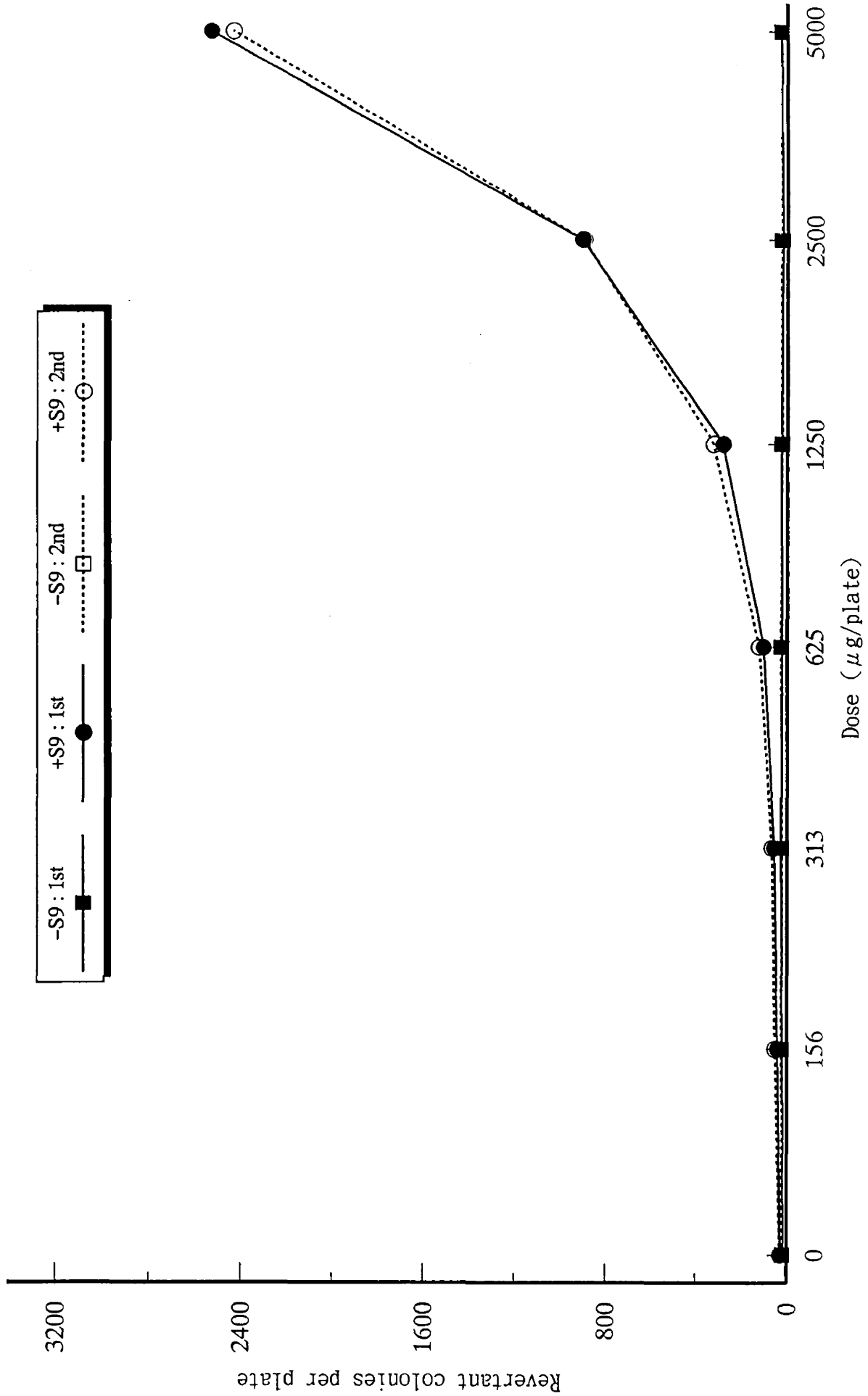


Figure 4. Bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in strain TA98

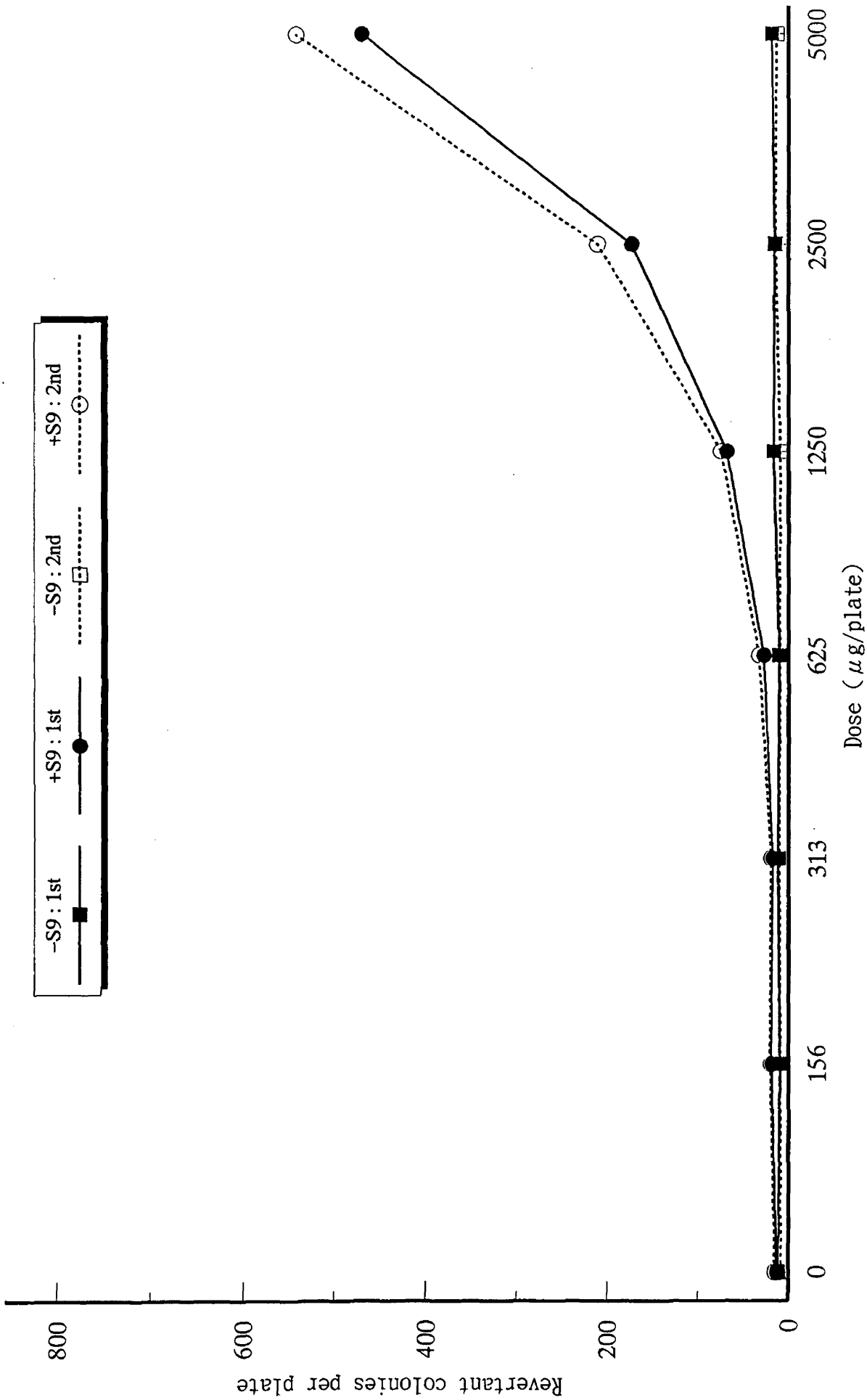


Figure 5. Bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in strain TA1537

Table 1. Results of the bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (1st trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S. D.]					
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
DMSO#	0	88 [94 \pm 7]	17 [14 \pm 3]	25 [27 \pm 5]	14 [16 \pm 2]	12 [11 \pm 2]	
Test sub.	156	92 [85 \pm 10]	16 [14 \pm 2]	27 [21 \pm 7]	18 [19 \pm 3]	10 [9 \pm 1]	
	313	114 [111 \pm 14]	13 [14 \pm 1]	18 [21 \pm 3]	26 [25 \pm 2]	14 [11 \pm 3]	
	625	97 [94 \pm 11]	10 [9 \pm 3]	28 [26 \pm 3]	22 [22 \pm 5]	10 [10 \pm 2]	
	1250	111 [100 \pm 11]	11 [10 \pm 3]	19 [17 \pm 3]	20 [23 \pm 7]	15 [16 \pm 1]	
	2500	102 [96 \pm 5]	14 [13 \pm 7]	23 [25 \pm 2]	20 [20 \pm 6]	15 [15 \pm 4]	
	5000	101 [100 \pm 3]	10 [9 \pm 1]	25 [20 \pm 5]	17 [25 \pm 7]	15 [18 \pm 4]	
Positive control		512 [497 \pm 16]	305 [325 \pm 20]	152 [131 \pm 18]	624 [600 \pm 40]	405 [483 \pm 24]	
		497 [481 \pm 16]	345 [325 \pm 20]	125 [117 \pm 18]	622 [600 \pm 40]	448 [483 \pm 24]	

: 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, 80 μ g/plate

Table 2. Results of the bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic 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	90 [88 \pm 4]	12 12 17 [14 \pm 3]	28 29 29 [29 \pm 1]	27 34 22 [28 \pm 6]	15 11 10 [12 \pm 3]	
Test sub.	156	154 145 137 [145 \pm 9]	15 17 14 [15 \pm 2]	28 25 31 [28 \pm 3]	35 41 41 [39 \pm 3]	13 20 22 [18 \pm 5]	
	313	149 173 158 [160 \pm 12]	14 16 17 [16 \pm 2]	20 26 23 [23 \pm 3]	62 50 51 [54 \pm 7]	16 18 17 [17 \pm 1]	
	625	202 222 224 [216 \pm 12]	14 19 17 [17 \pm 3]	19 27 23 [23 \pm 4]	116 90 97 [101 \pm 13]	25 27 29 [27 \pm 2]	
	1250	399 455 385 [413 \pm 37]	28 28 29 [28 \pm 1]	23 22 23 [23 \pm 1]	289 308 239 [279 \pm 36]	62 82 60 [68 \pm 12]	
	2500	996 788 858 [881 \pm 106]	37 57 51 [48 \pm 10]	30 25 33 [29 \pm 4]	844 874 994 [904 \pm 79]	182 164 174 [173 \pm 9]	
	5000	1508 1273 1531 [1437 \pm 143]	60 58 68 [62 \pm 5]	47 62 62 [57 \pm 9]	2480 2521 2545 [2515 \pm 33]	426 501 482 [470 \pm 39]	
Positive control		657 574 665 ^{a)} [632 \pm 50]	346 343 319 ^{b)} [336 \pm 15]	719 597 772 ^{c)} [696 \pm 90]	325 332 363 ^{a)} [340 \pm 20]	127 120 128 ^{b)} [125 \pm 4]	

: Solvent control

a) : 2-AA; 2-Aminanthracene, 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 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]					
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
DMSO#	0	91 [99 \pm 10]	12 15 15 [14 \pm 2]	20 19 21 [20 \pm 1]	19 16 25 [20 \pm 5]	6 10 7 [8 \pm 2]	
Test sub.	156	93 94 117 [101 \pm 14]	19 12 9 [13 \pm 5]	22 16 22 [20 \pm 3]	25 21 23 [23 \pm 2]	9 7 11 [9 \pm 2]	
	313	101 99 101 [100 \pm 1]	9 7 9 [8 \pm 1]	19 18 12 [16 \pm 4]	25 21 19 [22 \pm 3]	8 11 10 [10 \pm 2]	
	625	91 99 109 [100 \pm 9]	14 11 12 [12 \pm 2]	20 25 15 [20 \pm 5]	25 26 25 [25 \pm 1]	7 12 9 [9 \pm 3]	
	1250	114 108 118 [113 \pm 5]	13 11 5 [10 \pm 4]	22 21 21 [21 \pm 1]	18 21 24 [21 \pm 3]	6 11 9 [9 \pm 3]	
	2500	107 107 125 [113 \pm 10]	10 14 12 [12 \pm 2]	29 14 16 [20 \pm 8]	23 23 31 [26 \pm 5]	13 12 17 [14 \pm 3]	
	5000	123 110 123 [119 \pm 8]	14 12 13 [13 \pm 1]	20 17 23 [20 \pm 3]	23 26 21 [23 \pm 3]	9 14 15 [13 \pm 3]	
Positive control		424 421 499 ^{a)} [448 \pm 44]	360 340 368 ^{b)} [356 \pm 14]	126 152 117 ^{c)} [132 \pm 18]	612 636 628 ^{c)} [625 \pm 12]	492 427 462 ^{d)} [460 \pm 33]	

: 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, 80 μ g/plate

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (2nd 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	106 [116 \pm 10]	13 10 12 [12 \pm 2]	27 24 23 [25 \pm 2]	26 34 27 [29 \pm 4]	17 13 13 [14 \pm 2]	
Test sub.	156	117 150 145 [137 \pm 18]	20 18 11 [16 \pm 5]	22 25 25 [24 \pm 2]	54 50 49 [51 \pm 3]	18 25 16 [20 \pm 5]	
	313	149 181 138 [156 \pm 22]	19 24 18 [20 \pm 3]	22 30 21 [24 \pm 5]	74 50 68 [64 \pm 12]	21 18 18 [19 \pm 2]	
	625	196 235 249 [227 \pm 27]	21 18 29 [23 \pm 6]	23 22 29 [25 \pm 4]	121 135 110 [122 \pm 13]	37 28 32 [32 \pm 5]	
	1250	477 411 467 [452 \pm 36]	38 37 26 [34 \pm 7]	32 24 30 [29 \pm 4]	306 292 364 [321 \pm 38]	75 72 76 [74 \pm 2]	
	2500	840 932 985 [919 \pm 73]	42 58 48 [49 \pm 8]	32 25 29 [29 \pm 4]	899 886 906 [897 \pm 10]	220 200 213 [211 \pm 10]	
	5000	1578 1495 1224 [1432 \pm 185]	87 57 81 [75 \pm 16]	48 42 41 [44 \pm 4]	2731 2365 2193 [2430 \pm 275]	537 541 549 [542 \pm 6]	
Positive control		675 675 641 ^{a)} [664 \pm 20]	327 343 327 ^{b)} [332 \pm 9]	571 774 781 ^{c)} [709 \pm 119]	342 363 425 ^{d)} [377 \pm 43]	145 104 123 ^{b)} [124 \pm 21]	

: 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