2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

最　終　報　告　書

作成日　2004年　10月　7日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目　　次

要　　約 …… 8
緒　　言 …… 10
方　　法 …… 10
　1．被験物質，媒体，陽性対照物質及び陰性対照物質 …… 10
　2．検体液 …… 11
　3．試験菌株 …… 12
　4．S9 mix …… 12
　5．培地 …… 13
　6．無菌試験 …… 13
　7．試験方法 …… 13
　8．試験の成立条件 …… 14
　9．統計学的方法 …… 14
　10．判定基準 …… 14
試験成績 …… 15
　1．用量設定試験 …… 15
　2．本試験(I)及び本試験(II) …… 15
考　　察 …… 16
文　　献 …… 16

Attachment，Table及びFigureの目次

Table 1	Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (dose-finding test)	21
Table 2-1	Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test I)	22
Table 2-2	Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test I)	23
Table 3-1	Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test II)	24
Table 3-2	Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test II)	25
Figure 1-1	Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (dose-finding test :without S9 mix)	26
Figure 1-2	Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (dose-finding test :with S9 mix)	26
Figure 2-1	Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test I:without S9 mix)	27
Figure 2-2	Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test I:with S9 mix)	27
Figure 3-1	Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test II:without S9 mix)	28
Figure 3-2	Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test II:with S9 mix)	28

要　約

2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールの遺伝子突然変異誘発性の有無を，細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した．

試験菌株には*Salmonella typhimurium* のTA100，TA98，TA1535及びTA1537並びに*Escherichia coli* のWP2*uvrA*を用いた．試験は，プレインキュベーション法により，S9 mix無添加とS9 mix添加の場合について実施した．

1.　用量設定試験

本試験(I) 及び本試験(II)の試験濃度を設定するために用量設定試験を行った．試験濃度は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，全菌株1.22～5000 μg/plate（公比4，計7濃度）とした．

1.1 プレート上の析出物

プレート上に析出物は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの濃度においても認められなかった．

1.2 菌の生育阻害

菌の生育阻害は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，TA100，TA1535，TA98及びTA1537では312.5 μg/plate以上の濃度において，WP2*uvrA*では1250 μg/plate以上の濃度において認められた．

1.3 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株においても陰性対照の2倍未満であった．

2.　本試験(I)及び本試験(II)

用量設定試験の結果から本試験(I)及び本試験(II)の濃度は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，菌の生育阻害を示さないと考えられる濃度が4濃度以上含まれるように公比2で6濃度，すなわち，TA100，TA1535，TA98及びTA1537では，9.77，19.5，39.1，78.1，156.3及び312.5 μg/plate，WP2*uvrA*では，39.1，78.1，156.3，312.5，625及び1250 μg/plateとした．

2.1 プレート上の析出物

プレート上に析出物は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの濃度においても認められなかった．

2.2 菌の生育阻害

菌の生育阻害は，S9 mix無添加の場合，TA100，TA1535，TA98及びTA1537では156.3 μg/plate及び最高濃度の312.5 μg/plateにおいて，WP2*uvrA*では625 μg/plate及び最高濃度の1250 μg/plateにおいて認められた．S9 mix添加の場合，TA100，TA1535，TA98及びTA1537では最高濃度の312.5 μg/plateにおいて，WP2*uvrA*では625 μg/plate及び最高濃度の1250 μg/plateにおいて認められた．

2.3 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株においても陰性対照の2倍未満であった．

3. 陽性対照及び陰性対照

用量設定試験，本試験(I)及び本試験(II)で用いた陽性対照物質は明らかな陽性結果を示し，陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は，試験施設のバックグラウンドデータのほぼ範囲内であった．

4. 試験の再現性

本試験(I)及び本試験(II)の結果には再現性が認められた．

以上の結果，2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールはいずれの濃度においても，復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加しなかったことから，当試験の条件下において，2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する．

緒　言

2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールの安全性に関する非臨床試験の一環として，細菌を用いる復帰突然変異試験を行い，その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した．

方　法

1．被験物質，媒体，陽性対照物質及び陰性対照物質

1.1 被験物質

被験物質の2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノール（CAS No.88-85-7）は，分子量：240.22，水に不溶，通常の取り扱いにおいては安定な黄色の塊，溶融時は黄色澄明の液体である．

当試験には，　　から購入したもの（ロット番号：　　，純度：96.0 %）を用いた．入手後は，試験施設の被験物質保管室の保管庫に冷蔵（2～10 °C）の条件下で保管した．

1.2 媒体

媒体には，ジメチルスルホキシド［以下DMSO，紫外部吸収スペクトル用，ロット番号：NJ151，株式会社同仁化学研究所，使用期限：2008年5月5日（自社規定），保管条件：室温（15～30 °C）・遮光］を用いた．

1.3 陽性対照物質

試験には下記の物質を使用した．

1.3.1　2-アミノアントラセン（2-aminoanthracene，略名：2AA）

黄色から緑色の粉末，純度：97.4 %，ロット番号：90K3670，製造元：SIGMA，使用期限：2007年1月7日（自社規定），保管条件：冷蔵（2～8 °C）・防湿．

1.3.2　アジ化ナトリウム（sodium azide，略名：NaN_3）

白色～ほとんど白色の結晶（特級，単品），純度：99.7 %及び99.8%，ロット番号：M8K9848及びM3H9553，製造元：ナカライテスク株式会社，使用期限：2003年11月18日（自社規定）及び2008年9月1日（自社規定），保管条件：冷蔵（1～10 °C）．

1.3.3　9-アミノアクリジン（9-aminoacridine hydrochloride，略名：9AA）

黄色の粉末（特級，単品），純度：98.3 %及び97.6%，ロット番号：M8F1294及びM3N4147，製造元：ナカライテスク株式会社，使用期限：2003年11月18日（自社規定）及び2008年10月13日（自社規定），保管条件：冷蔵（1～10 °C）．

1.3.4　2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド［2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide，略名：AF-2］

黄みの赤色結晶性粉末（特級，単品），純度：99.0 %，ロット番号：SEL1402，製造元：和光純薬工業株式会社，使用期限：2007年2月4日(自社規定)，保管条件：冷蔵(1～10 °C)・遮光．

1.4 陰性対照物質

陰性対照物質は，被験物質の媒体として用いたDMSOとした．

2．検体液

2.1 被験物質

用量設定試験では，被験物質105 mgをDMSOに溶解して2 mLとし，最高濃度液(52.5 mg/mL)を調製した．本試験(I) 及び本試験(II)では，被験物質105 mgをDMSOに溶解して8 mLとし，最高濃度液(13.125 mg/mL)を調製した．最高濃度液より低い濃度液は，用量設定試験，本試験(I)及び本試験(II)とも最高濃度液からDMSOで順次希釈して調製した．なお，調製に際して，純度による換算を行った(換算計数：1.05)．調製は用時に行い，使用後の残液は廃棄処分した．

2.2 陽性対照物質

2AA，9AA及びAF-2はDMSO（紫外部吸収スペクトル用，ロット番号：2AA；NJ151，9AA；KC066及びNJ151，AF-2；LR170，株式会社同仁化学研究所）に，NaN_3は注射用水（局方品，ロット番号：K1C78及びK2K75，株式会社大塚製薬工場）に溶解して，以下に示す濃度液を調製した（2AAの調製日：2003年7月7日，9AA及びNaN_3の調製日：2002年10月28日及び2003年10月14日，AF-2の調製日：2003年1月31日，各調製液の使用期限は調製後1年以内とした）．

各調製液は，チューブ（2 mL容セラムチューブ，住友ベークライト株式会社）に0.5 mLずつ分注し，-80 °C設定の冷凍庫［型式：MDF-291AT（被験物質保管庫 No.8），三洋電機株式会社］内に凍結保管した．試験の際には各調製液を融解して使用し，使用後の残液は廃棄処分した．

	菌株名	物質名	調製濃度 (μg/mL)	試験濃度 (μg/plate)
S9 mix (＋)	TA100	2AA	10	1
	TA1535	2AA	20	2
	WP2*uvrA*	2AA	100	10
	TA98	2AA	5	0.5
	TA1537	2AA	20	2
S9 mix (－)	TA100	AF-2	0.1	0.01
	TA1535	NaN_3	5	0.5
	WP2*uvrA*	AF-2	0.1	0.01
	TA98	AF-2	1	0.1
	TA1537	9AA	800	80

陽性対照物質は，その反応性が試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあったことから，生物学的に充分な活性を有していたと判断した．

3．試験菌株

試験菌株には，国内各GLP準拠毒性試験ガイドラインにおいて規定されており，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*S.typhimurium*のTA100，TA98，TA1535及びTA1537並びに*E.coli*のWP2*uvrA*を使用した．TA100及びTA98は1996年10月18日に，TA1535，TA1537及びWP2*uvrA*は1995年2月25日に，いずれも中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センターから入手した．

菌株の特性として「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインとGLP-」[1)]に従い，アミノ酸要求性，紫外線感受性，膜変異rfa特性及び薬剤耐性因子R-factorプラスミドの有無を検査し（TA100及びTA98の検査日：2002年2月26日～2月28日，TA1535，TA1537及びWP2*uvrA*の検査日：2001年11月6日～11月8日），試験施設の基準に適合しているコロニーを選択した（Attachment 1）．

菌株は，特性検査の結果から選択したコロニーを培養した菌懸濁液0.8 mLに対してDMSOを0.07 mLの割合で加えたものを，チューブ（2 mL容セラムチューブ，住友ベークライト株式会社）に200μLずつ分注し，-80 °C設定の冷凍庫［型式：BFV-130(LR)，エスペック株式会社］内に凍結保管した（TA100及びTA98の分注日：2002年4月10日，TA1535，TA1537及びWP2*uvrA*の分注日：2001年12月26日，使用期限：分注後2年以内）．

菌株の前培養には，OXOID NUTRIENT BROTH No.2（ロット番号：219916，OXOID LTD.）2.0 gに注射用水80 mLの割合で加えて高圧蒸気滅菌（121 °C，15分）した培養液を使用した．乾熱滅菌（180 °C，1時間，以下同様）したモルトン栓付のL字管（容量：約40 mL）に先の培養液を10 mL分注し，ここへ融解した菌液を20 μL接種した．これを往復振盪型式（振盪数：90回／分，振幅：4 cm）の振盪器（型式：M-100^{N}，タイテック株式会社）を用いて，37 °Cで8時間振盪培養した．培養終了後，菌懸濁液の濁度を測定し，そのO.D.値から生菌数を求めた（Attachment 2）．また，菌懸濁液は使用時まで室温で保管した．

なお，実験操作は空調管理されたAmes試験室（A棟）にて行った．

4．S9 mix

S9は，Attachment 3の条件により2003年8月1日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの（ロット番号：03080105）を使用した．S9は，2003年8月28日に購入し，使用時まで-80°C設定の冷凍庫［型式：BFV-130(LR)，エスペック株式会社］内に凍結保管した．

S9 mixは，S9 mix用のCofactor（商品名：Cofactor-Ⅰ，ロット番号：999304，オリエンタル酵母工業株式会社）を注射用水で溶解し，メンブランフィルター（φ0.2 μm，Nalge）で濾過した後，使用直前にS9を加えて調製した．S9 mixの組成をAttachment 4に示した．

5．培地

最少グルコース寒天平板培地は，テスメディアAN培地(ロット番号：ANI550GS，製造日：2003年7月17日，オリエンタル酵母工業株式会社)を使用した．テスメディアAN培地の組成をAttachment 5に示した．

トップアガーは，注射用水にBacto Agar（ロット番号：2120028，DIFCO）が0.6 %，塩化ナトリウムが0.5 %の割合になるように加えて高圧蒸気滅菌（121 °C，20分，以下同様）した．この水溶液に*S. typhimurium*の場合には0.5 mmol/L L-ヒスチジンと0.5 mmol/L D-ビオチンを混合した水溶液を，*E.coli*の場合には0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を，それぞれ容量比10：1の割合で加えて調製した．なお，各アミノ酸溶液はフィルターシステム（ϕ0.22 μm，CORNING）で濾過したものを使用した．

6．無菌試験

被験物質の最高濃度液及びS9 mixの無菌試験は，用量設定試験，本試験(I) 及び本試験(II)実施の際に，それぞれ2枚のプレートを用いて実施した．

試験は，被験物質の最高濃度液0.1 mLまたはS9 mix 0.5 mLに，45 °Cに保温したトップアガー2 mLを加えて最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ，プレートを転倒して37 °C設定の恒温器（型式： IA-81，ヤマト科学株式会社）内で約48時間培養した後，コロニーの出現を調べた．被験物質の最高濃度液の無菌試験には，用量設定試験では52.5 mg/mL濃度液を，本試験(I) 及び本試験(II) では13.125 mg/mL濃度液を用いた．

7．試験方法

7.1 試験操作

試験条件をAttachment 6に示した．

試験は，プレインキュベーション法により，代謝活性化によらない場合（S9 mix無添加）と代謝活性化による場合（S9 mix添加）で行った．すなわち，乾熱滅菌した試験管（15.5×100 mm，清浄試験管ラルボ，テルモ株式会社）に，①検体液0.1 mL，②高圧蒸気滅菌した0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液（pH7.4）0.5 mL（代謝活性化によらない場合）またはS9 mix 0.5 mL（代謝活性化による場合），③菌懸濁液0.1 mLの順に加え，往復振盪型式の振盪器を用いて37 °Cで20分間インキュベーションした．その後，45 °Cに保温したトップアガーを2 mL加えて混合した後，最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ，プレートを転倒して37 °C設定の恒温器内で約48時間培養した．

培養終了後，プレート上での析出物の有無を肉眼で観察した後，復帰変異コロニー数を，コロニーアナライザー（CA-11D　エームステストシステム）により計測し，その後，菌の生育阻害の

有無を100倍の顕微鏡下で観察した．プレート上での析出物の有無は，培養開始時にも肉眼で観察した．

プレートは，菌株，代謝活性化の有無及び濃度の組み合わせごとに用量設定試験では1枚，本試験(I) 及び本試験(II)では各3枚使用した．また，試験管及びプレートは，菌株ごとに油性インクで色分けすることで識別した．

7.2 用量設定試験

用量設定試験の試験濃度は，「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成9年10月31日）に従い，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株も5000μg/plateを最高濃度として，以下公比4で1250，312.5，78.1，19.5，4.88及び1.22μg/plateの計7濃度を設定した．対照として， 全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた．

7.3 本試験(I) 及び本試験(II)

用量設定試験の結果から本試験(I)及び本試験(II)の濃度は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，菌の生育阻害を示さないと考えられる濃度が4濃度以上含まれるように公比2で6濃度，すなわち，TA100，TA1535，TA98及びTA1537では，9.77，19.5，39.1，78.1，156.3及び312.5 μg/plate，WP2*uvrA*では，39.1，78.1，156.3，312.5，625及び1250 μg/plateとした．対照として，全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた．

8．試験の成立条件

無菌試験で被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入がなく，陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数が試験施設のバックグラウンドデータ（Attachment 7）の範囲内にあり，さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験が成立するものとした．

9．統計学的方法

復帰変異コロニー数は，濃度ごとに平均値と標準偏差を算出した．なお，有意差検定は実施しなかった．

10．判定基準

試験の結果は，被験物質を処理したプレートにおける復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上の値を示し，さらに濃度に依存して増加した場合を陽性とした．

試験成績

1．用量設定試験

用量設定試験の結果をTable 1及びFigure 1-1～1-2に示した．

被験物質を処理したプレート上の析出物は，培養開始時及び培養終了時とも，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合のいずれの濃度においても認められなかった．

菌の生育阻害は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，TA100，TA1535，TA98及びTA1537では312.5 μg/plate以上の濃度において，WP2*uvrA*では1250 μg/plate以上の濃度において認められた．

復帰変異コロニー数は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株においても陰性対照の2倍未満であった．

無菌試験では，被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった．

陽性対照物質は，明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した．また，陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は，試験施設のバックグラウンドデータのほぼ範囲内にあった．

2．本試験(I) 及び本試験(II)

本試験(I)の結果をTable 2-1～2-2及びFigure 2-1～2-2に，本試験(II)の結果をTable 3-1～3-2及びFigure 3-1～3-2に示した．

被験物質を処理したプレート上の析出物は，培養開始時及び培養終了時とも，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合のいずれの濃度においても認められなかった．

菌の生育阻害は，S9 mix無添加の場合，TA100，TA1535，TA98及びTA1537では156.3 μg/plate及び最高濃度の312.5 μg/plateにおいて，WP2*uvrA*では625 μg/plate及び最高濃度の1250 μg/plateにおいて認められた．S9 mix添加の場合，TA100，TA1535，TA98及びTA1537では最高濃度の312.5 μg/plateにおいて，WP2*uvrA*では625 μg/plate及び最高濃度の1250 μg/plateにおいて認められた．

復帰変異コロニー数は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株においても陰性対照の2倍未満であった．

無菌試験では，被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった．

陽性対照物質は，明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した．また，陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は，試験施設のバックグラウンドデータのほぼ範囲内にあった．

考　察

2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールの遺伝子突然変異誘発性の有無を，細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した．

2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールは，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株のすべての濃度において，復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以上に増加しなかった．

各試験における無菌試験では，被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった．

各試験における陽性対照物質は，明らかな復帰変異コロニー数の増加を示し，陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は，試験施設のバックグラウンドデータのほぼ範囲内にあった．

本試験(I) 及び本試験(II)には再現性が認められた．

以上の結果，2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールはいずれの濃度においても，復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加しなかったことから，当試験の条件下において，2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する．なお，2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールは当試験施設で同時期に実施した哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性の結果が得られている[2]．また，関連物質の2，4-ジニトロフェノールでは復帰変異試験において疑陽性，染色体異常試験において陽性との報告がある[3), 4)]．

文　献

1) 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，平成3年3月．
2) 三輪芳久ら：2-*sec*-ブチル-4，6-ジニトロフェノールの哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験（試験番号：970922），株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所（2004）．
3) 野田篤ら：化学物質毒性試験報告，8，27（2001）．
4) 野田篤ら：化学物質毒性試験報告，8，33（2001）．

Table 1. Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (dose-finding test)

With (+) or Without (−) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (−)	Negative control	116	9	34	13	11
	1.22	91	6	31	17	13
	4.88	119	4	24	19	6
	19.5	106	6	40	14	11
	78.1	132	7	26	19	5
	312.5	60*	4*	27	9*	2*
	1250	0*	3*	13*	4*	1*
	5000	0*	2*	0*	0*	0*
S9 mix (+)	Negative control	115	7	21	24	13
	1.22	127	8	41	24	16
	4.88	128	10	26	20	13
	19.5	123	13	20	24	12
	78.1	148	8	31	23	12
	312.5	119*	6*	37	20*	7*
	1250	0*	0*	15*	2*	0*
	5000	0*	0*	0*	0*	0*
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	516	594	125	478	387
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration (μg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1356	386	884	582	268

Negative control: Dimethyl sulfoxide.
AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride; 2AA: 2-Aminoanthracene.

*: Bacterial growth inhibition was observed.

Table 2-1. Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test Ⅰ)

With (+) or Without (−) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (−)	Negative control	122 133 136 (130±7.4)	6 7 10 (8±2.1)	19 32 38 (30±9.7)	11 13 17 (14±3.1)	13 15 20 (16±3.6)
	9.77	124 132 151 (136±13.9)	5 6 10 (7±2.6)		7 14 19 (13±6.0)	14 16 20 (17±3.1)
	19.5	119 138 158 (138±19.5)	5 10 11 (9±3.2)		8 12 18 (13±5.0)	14 14 18 (15±2.3)
	39.1	120 126 158 (135±20.4)	3 11 12 (9±4.9)	27 28 29 (28±1.0)	13 14 14 (14±0.6)	10 14 18 (14±4.0)
	78.1	125 152 162 (146±19.1)	3 4 7 (5±2.1)	20 27 36 (28±8.0)	9 16 25 (17±8.0)	11 14 22 (16±5.7)
	156.3	129* 131* 141* (134±6.4)	2* 5* 6* (4±2.1)	29 33 34 (32±2.6)	7* 7* 17* (10±5.8)	8* 10* 13* (10±2.5)
	312.5	52* 53* 54* (53±1.0)	3* 4* 5* (4±1.0)	27 32 34 (31±3.6)	9* 10* 10* (10±0.6)	4* 4* 10* (6±3.5)
	625			14* 20* 24* (19±5.0)		
	1250			8* 8* 12* (9±2.3)		
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	486 518 552 (519±33.0)	526 578 589 (564±33.7)	121 123 140 (128±10.4)	372 405 412 (396±21.4)	441 471 501 (471±30.0)

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

( ) : Mean±S.D.

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride.

*: Bacterial growth inhibition was observed.

Table 2-2. Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test Ⅰ)

With (+) or Without (−) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	124 135 162 (140±19.6)	5 7 12 (8±3.6)	26 29 44 (33±9.6)	24 24 25 (24±0.6)	20 26 30 (25±5.0)
	9.77	139 142 149 (143±5.1)	4 9 11 (8±3.6)		19 23 23 (22±2.3)	19 24 41 (28±11.5)
	19.5	143 144 144 (144±0.6)	3 5 7 (5±2.0)		17 23 26 (22±4.6)	21 24 35 (27±7.4)
	39.1	137 153 185 (158±24.4)	9 9 14 (11±2.9)	18 34 36 (29±9.9)	15 25 39 (26±12.1)	17 20 24 (20±3.5)
	78.1	186 196 206 (196±10.0)	6 7 10 (8±2.1)	32 37 42 (37±5.0)	18 25 30 (24±6.0)	23 24 34 (27±6.1)
	156.3	165 199 207 (190±22.3)	3 7 9 (6±3.1)	24 27 35 (29±5.7)	20 24 30 (25±5.0)	17 24 31 (24±7.0)
	312.5	93* 101* 109* (101±8.0)	6* 6* 6* (6±0.0)	32 35 40 (36±4.0)	12* 17* 22* (17±5.0)	12* 15* 17* (15±2.5)
	625			22* 24* 25* (24±1.5)		
	1250			11* 14* 19* (15±4.0)		
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration (μg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1407 1412 1459 (1426±28.7)	397 406 424 (409±13.7)	781 799 973 (851±106.0)	491 515 563 (523±36.7)	199 254 287 (247±44.5)

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

( ) : Mean±S.D.

2AA: 2-Aminoanthracene.

*: Bacterial growth inhibition was observed.

Table 3-1. Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test II)

With (+) or Without (−) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (−)	Negative control	100 107 134 (114±18.0)	12 13 14 (13±1.0)	25 25 33 (28±4.6)	11 14 16 (14±2.5)	5 7 14 (9±4.7)
	9.77	102 109 113 (108±5.6)	6 12 12 (10±3.5)		13 15 22 (17±4.7)	3 6 6 (5±1.7)
	19.5	113 117 124 (118±5.6)	6 7 12 (8±3.2)		14 17 25 (19±5.7)	4 6 7 (6±1.5)
	39.1	112 118 147 (126±18.7)	5 7 13 (8±4.2)	27 33 46 (35±9.7)	9 17 24 (17±7.5)	5 9 14 (9±4.5)
	78.1	113 132 132 (126±11.0)	7 10 23 (13±8.5)	27 29 30 (29±1.5)	12 14 23 (16±5.9)	5 5 12 (7±4.0)
	156.3	114* 136* 139* (130±13.7)	3* 4* 10* (6±3.8)	20 35 45 (33±12.6)	13* 17* 20* (17±3.5)	5* 7* 9* (7±2.0)
	312.5	58* 65* 73* (65±7.5)	2* 4* 6* (4±2.0)	27 29 32 (29±2.5)	12* 13* 15* (13±1.5)	5* 5* 5* (5±0.0)
	625			21* 23* 31* (25±5.3)		
	1250			8* 15* 16* (13±4.4)		
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	541 576 581 (566±21.8)	494 599 655 (583±81.7)	127 136 136 (133±5.2)	369 395 428 (397±29.6)	331 332 498 (387±96.1)

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

( ) : Mean±S.D.

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride.

*: Bacterial growth inhibition was observed.

Table 3-2. Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria (mutagenicity test II)

With (+) or Without (−) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	95 96 107 (99±6.7)	7 10 11 (9±2.1)	29 30 37 (32±4.4)	19 26 32 (26±6.5)	12 13 13 (13±0.6)
	9.77	101 110 125 (112±12.1)	6 6 13 (8±4.0)		18 20 25 (21±3.6)	15 17 22 (18±3.6)
	19.5	122 125 138 (128±8.5)	6 11 17 (11±5.5)		27 30 30 (29±1.7)	14 18 24 (19±5.0)
	39.1	96 101 141 (113±24.7)	6 9 10 (8±2.1)	26 31 32 (30±3.2)	18 20 31 (23±7.0)	10 12 14 (12±2.0)
	78.1	133 139 158 (143±13.1)	9 10 11 (10±1.0)	30 37 38 (35±4.4)	20 27 32 (26±6.0)	20 20 33 (24±7.5)
	156.3	142 143 157 (147±8.4)	5 6 12 (8±3.8)	25 38 40 (34±8.1)	23 24 26 (24±1.5)	15 26 27 (23±6.7)
	312.5	90* 112* 114* (105±13.3)	5* 5* 5* (5±0.0)	32 36 41 (36±4.5)	19* 24* 27* (23±4.0)	12* 26* 30* (23±9.5)
	625			17* 23* 37* (26±10.3)		
	1250			10* 14* 19* (14±4.5)		
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration (μg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1295 1314 1370 (1326±39.0)	398 438 457 (431±30.1)	807 1041 1066 (971±142.9)	483 490 507 (493±12.3)	262 280 288 (277±13.3)

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

( ) : Mean±S.D.

2AA: 2-Aminoanthracene.

*: Bacterial growth inhibition was observed.

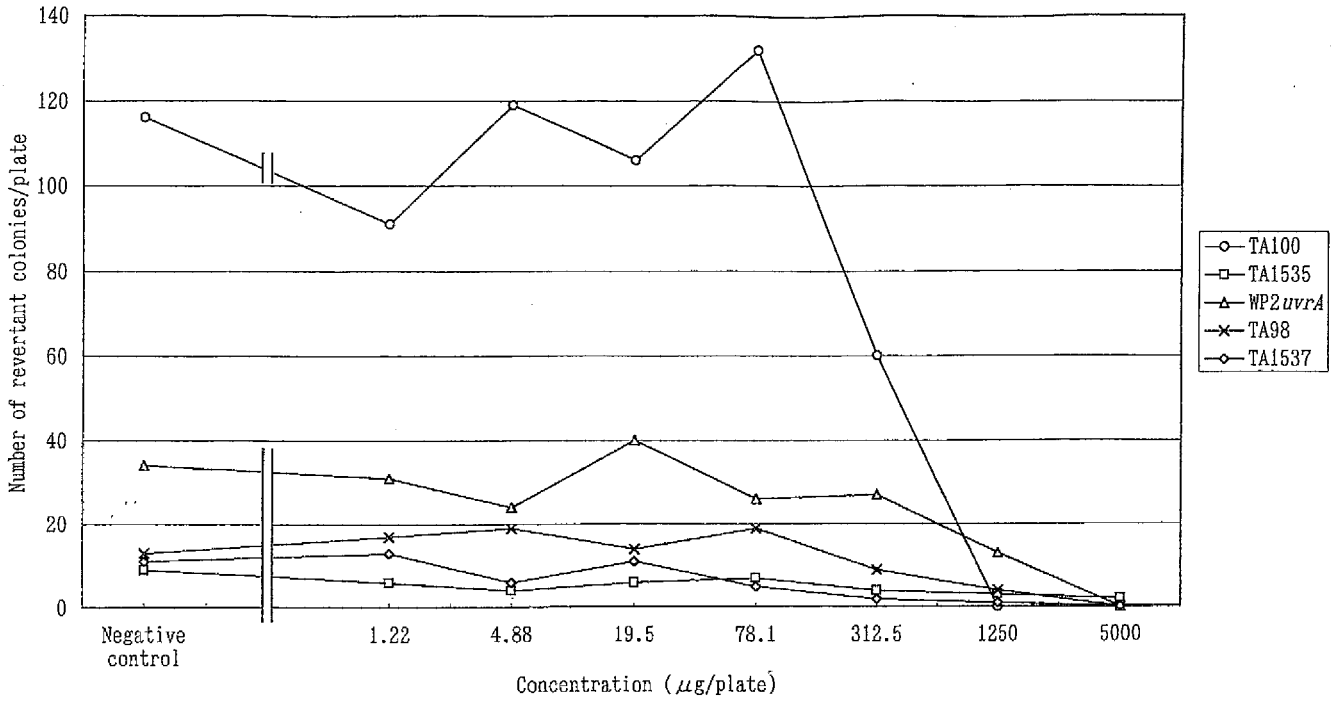

Figure 1-1. Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria
(dose-finding test: without S9 mix)

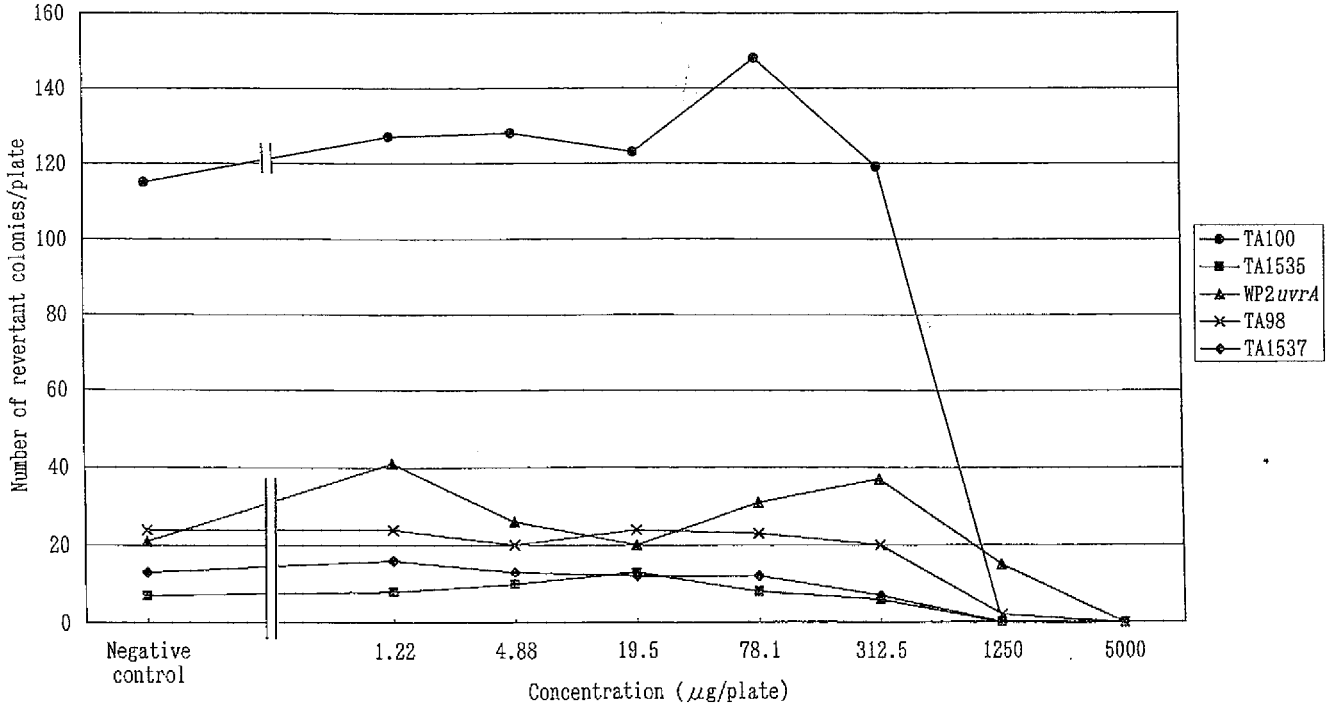

Figure 1-2. Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria
(dose-finding test: with S9 mix)

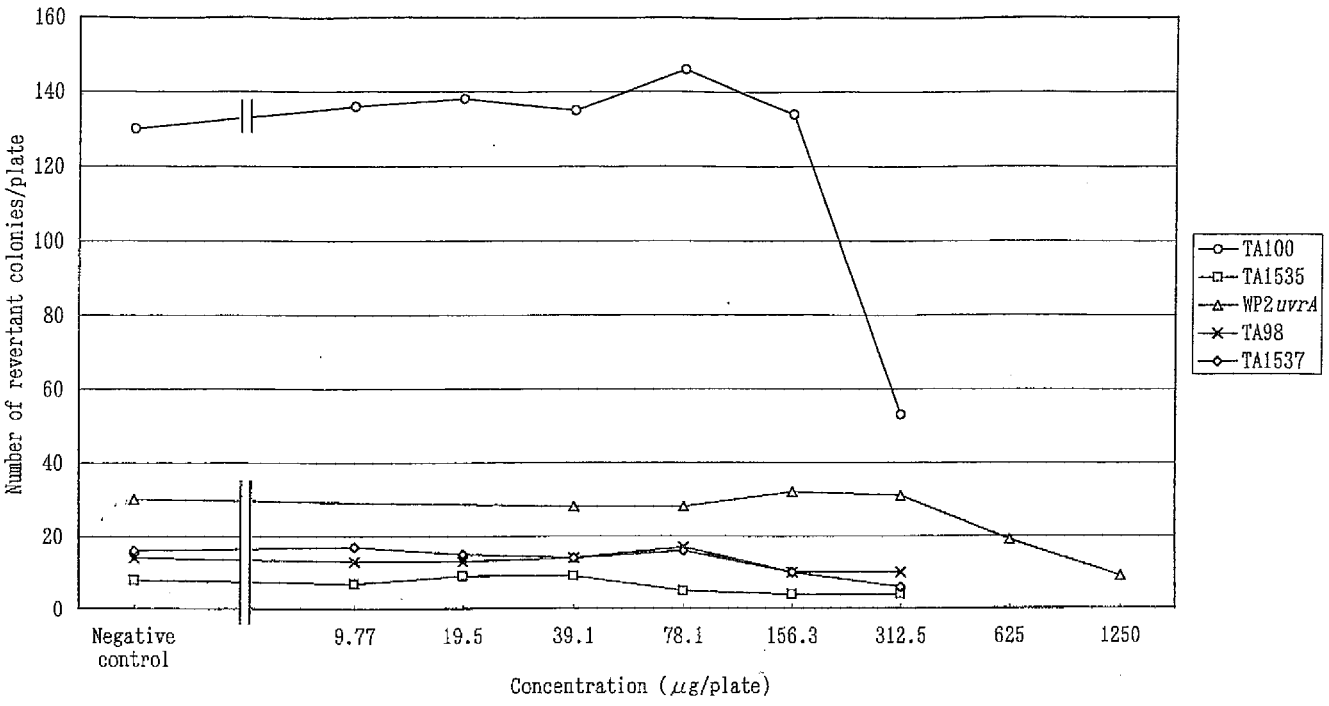

Figure 2-1. Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria
(mutagenicity test Ⅰ: without S9 mix)

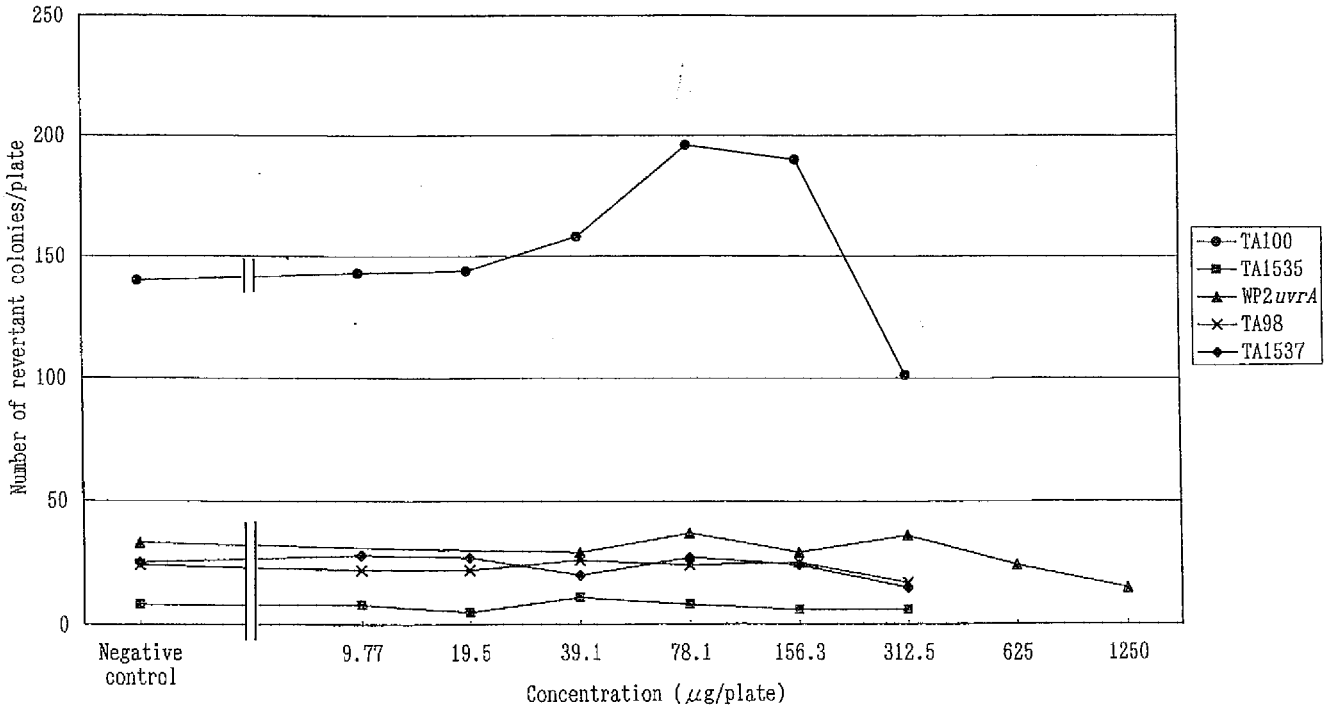

Figure 2-2. Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria
(mutagenicity test Ⅰ: with S9 mix)

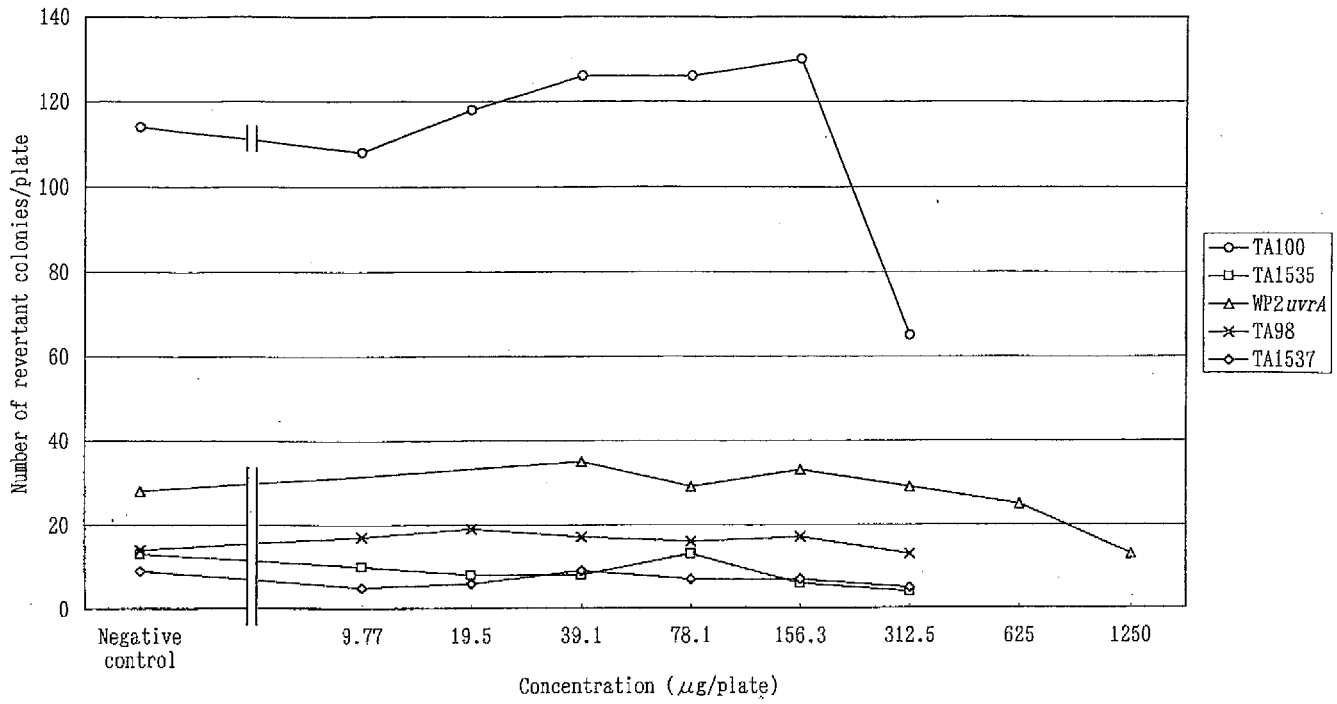

Figure 3-1. Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria
(mutagenicity test II: without S9 mix)

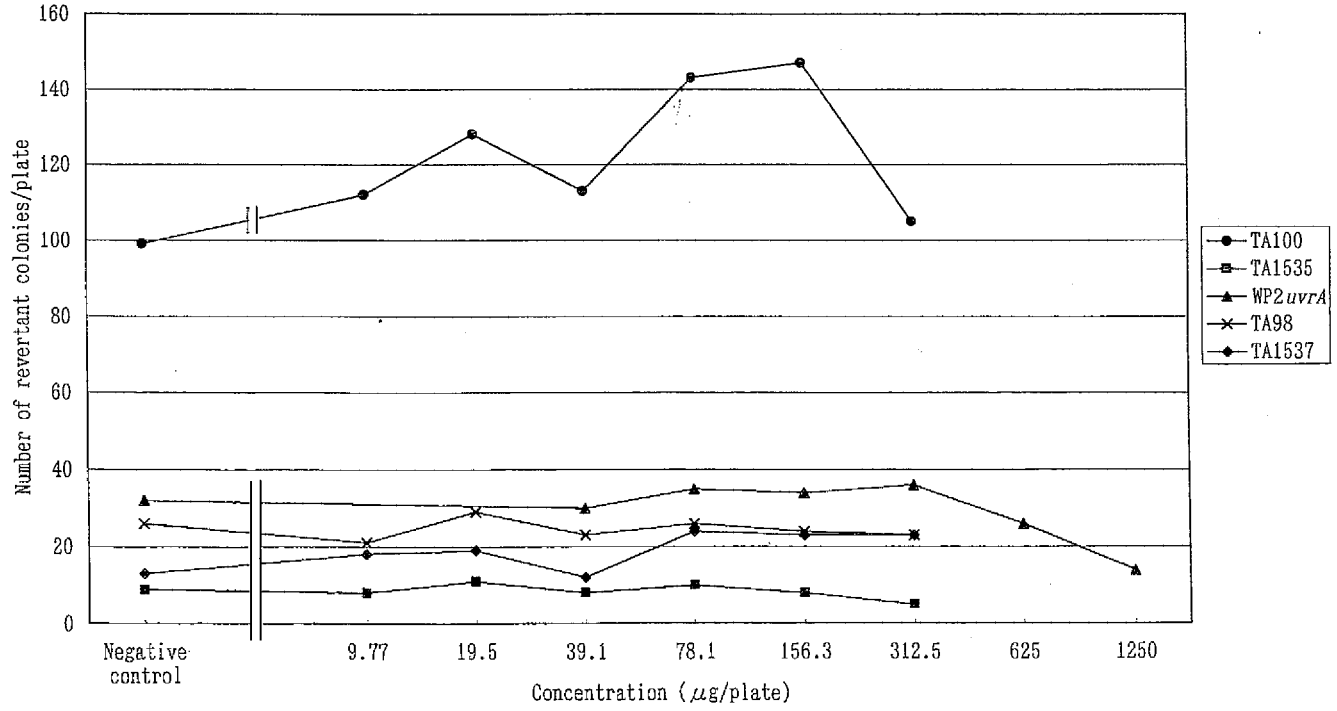

Figure 3-2. Reverse mutation test of 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol in bacteria
(mutagenicity test II: with S9 mix)