2004年11月10日

4,4'-ビフェニルジオールの
細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬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】

頁

要　約 ---------- 1

材料および方法 ---------- 3

1. 被験物質 ---------- 3

2. 陽性対照物質 ---------- 3

3. 検定菌 ---------- 3

4. 試験材料 ---------- 4

5. 被験物質調製液の調製 ---------- 5

6. 試験操作 ---------- 6

7. 判定 ---------- 7

結果および考察 ---------- 8

1. 用量設定試験 ---------- 8

2. 本試験 ---------- 8

参考文献 ---------- 10

Tables　1～3

Figures　1、2

【要　　約】

4,4'-ビフェニルジオールについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、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、プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加および添加条件で試験を行った。

用量設定試験を 50.0～5000 μg/plate の範囲に公比約 3 で 5 用量を設定して行ったところ、WP2 *uvrA* 以外の検定菌の S9 mix 無添加および添加条件について、1500 μg/plate 以上の用量、あるいは最高用量の 5000 μg/plate において生育阻害が認められた。WP2 *uvrA* については、生育阻害は認められなかった。

これらの結果に基づき、最高用量を TA100 については 2500 μg/plate、それ以外の検定菌については 5000 μg/plate とし、いずれの検定菌についても公比 2 で 6 用量（78.1～2500 μg/plate あるいは 156～5000 μg/plate）を設定して、2 回の本試験を行った。その結果、用いたすべての検定菌において、S9 mix の添加の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、4,4'-ビフェニルジオールは、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。

【材料および方法】

1. 被験物質

被験物質である 4,4'-ビフェニルジオール［英名：4,4'-Biphenyldiol、ロット番号：製造：　　］は白色結晶であり、　　)から提供を受けた。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、遮光して室温で保管した。

被験物質は実験期間中安定であったことが、被験物質提供者において確認された。なお、被験物質に関する資料（非 GLP データ）は、被験物質提供者の責任に基づき確認、提供された資料であることから、試験結果の信頼性を損なうものではないと判断した。

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	製造者	ロット番号（購入日）	純度
2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	AF2	和光純薬工業㈱	CKQ1402 (2001 年 9 月 13 日)	99.0%
ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	SA	和光純薬工業㈱	ELE2329 (2001 年 5 月 15 日)	99.2%
9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	9AA	Sigma Chem. Co.	106F06681 (2001 年 5 月 15 日)	97%以上
2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ	2AA	和光純薬工業㈱	DWK5667 (2001 年 9 月 13 日)	97.4%

AF2、9AA および 2AA はジメチルスルホキシド（DMSO、和光純薬工業㈱、ロット番号：WAR5208）に、SA は超純水に溶解し、所定の濃度に調製した後-20℃で凍結保存し、調製後 6 か月以内のものを用時に解凍して用いた。

3. 検定菌

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従って、*Salmonella typhimurium*（以下、*S. typhimurium*）TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli*（以下、*E. coli*）WP2 *uvrA* を用いた。

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、いずれも日本バイオアッセイ研究センターの　　から分与された。*S. typhimurium* の 4 菌株を用いる試験は、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]、*E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いる試験は、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。

検定菌は-80℃で凍結保存したものを用い、特性確認は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た。

試験に際して、ニュートリエントブロス No. 2（Oxoid Ltd.）を 12 mL 入れた L 字型試験管に解凍した種菌を 12 μL（TA100、TA98 および TA1535）あるいは 6 μL（TA1537 および WP2 *uvrA*）接種し、37℃で 10 時間往復振とう培養したものを試験菌液とした。分光光度計（㈱島津製作所、型式：UV-120-02）により 660 nm の吸光度を測定し、試験菌液の増殖を確認した。試験に用いた検定菌の生菌数を段階希釈法により求め、Appendix 2 に示した。

4. 試験材料

1）合成培地

培地は、極東製薬工業㈱製の最少グルコース寒天培地〔ロット番号：DZA39D01、2002 年 9 月 13 日製造（用量設定試験）および、ロット番号：DZA3AB01、2002 年 10 月 11 日製造（本試験 I および II）〕を用いた。なお、培地 1 L あたりの組成は下記のとおりで、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

下記の水溶液（A）に（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 Lab.）	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) S9 mix

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

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

*：7 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール（PB）および 5,6-ベンゾフラボン（BF）の併用投与で酵素誘導して作製した S9（キッコーマン㈱、ロット番号：RAA-475、2002 年 12 月 6 日製造）を購入し、-80℃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 であり、いずれも腹腔内投与したもので、肝臓の摘出および S9 の調製は 5 日目であった。

5. 被験物質調製液の調製

被験物質は、50 mg/mL の濃度で水には溶解しないが、DMSO には溶解することから、試験に際しては、DMSO（和光純薬工業㈱、ロット番号：WAJ4459）に溶解して最高用量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。調製濃度を

以下に示す。なお、調製時に、発熱、発泡および変色は認められなかった。

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

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

6. 試験操作

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 無添加条件および哺乳動物（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変異原性を試験する S9 mix 添加条件で行った。

小試験管中に被験物質調製液 0.1 mL、S9 mix 無添加条件では 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、S9 mix 添加条件では 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、トップアガー 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、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。陰性および陽性対照の結果については、同時に実施した他試験と共通に用いた。

培養は 37℃で 48 時間行い、発生した復帰変異コロニー数を、コロニーアナライザー（システムサイエンス㈱、CA-11）または目視により算定した。被験物質に由来する沈澱の有無は、肉眼により観察した。また、生育阻害の有無については、肉眼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復帰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。

なお、最高用量の被験物質調製液 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ合成培地平板上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

上記の方法により、用量設定試験は 1 回、本試験は同一用量について 2 回実施し、結果の再現性を確認した。

7. 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無添加条件あるいはS9 mix添加条件において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、陰性対照値のそれに比べて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、本試験系において変異原性を有するもの（陽性）と判定することとした。

【結果および考察】

1. 用量設定試験

「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」に従って、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て用量設定試験を行った（Table 1）。その結果、TA100 の S9 mix 無添加および添加条件については 1500 μg/plate 以上の用量で、TA1535、TA98 および TA1537 の S9 mix 無添加および添加条件については最高用量の 5000 μg/plate において生育阻害が認められた。WP2 *uvrA* については、生育阻害は認められなかった。また、被験物質に由来する沈澱は、S9 mix 無添加条件については 1500 μg/plate 以上の用量で、S9 mix 添加条件については最高用量の 5000 μg/plate で認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量を TA100 については 2500 μg/plate、それ以外の検定菌については 5000 μg/plate とした。

2. 本試験

上記の最高用量に基づき、公比 2 で 6 用量（TA100：78.1～2500 μg/plate、TA100 以外の検定菌：156～5000 μg/plate）を設定して、いずれも 2 回の本試験を行った（Table 2, 3、Figure 1, 2）。その結果、TA100 の S9 mix 無添加および添加条件については 1250 μg/plate 以上の用量で、TA1535、TA98 および TA1537 の S9 mix 無添加および添加条件については 2500 μg/plate 以上の用量において生育阻害が認められた。WP2 *uvrA* については、生育阻害は認められなかった。

復帰変異コロニー数は、用いたすべての検定菌において、S9 mix の添加の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

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変異原性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データ（Appendix 3）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。

なお、4,4'-ビフェニルジオールについては、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では構造異常および倍数性ともに陽性の[4]結果が得られている。また、関連物質である4,4'-Diaminodiphenylについては、復帰突然変異試験で陽性の[5]結果が報告されている。Biphenyl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マウスS9を用いた代謝活性化法において陽性の結果が報告されている[6-8]。*o*-Phenylphenolについては復帰突然変異試験、染色体異常試験ともに陰性の結果が報告されている[9]。2,5-Dihydroxybiphenylについては染色体異常試験で陰性の結果が報告されている[10]。Phenolについては復帰突然変異試験では陰性、*Allium cepa*を用いた染色体異常試験では陰性の結果が報告されている[11,12]。

以上の結果に基づき、4,4'-ビフェニルジオールは、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。

【参　考　文　献】

1) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagano, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp. 273-285.

2) D. M. Maron, B. N. Ames, Mutat. Res., 113, 173 (1983).

3) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds., by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.

4) 「4,4'-ビフェニルジオールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験」，試験計画番号：G-02-041（2004）.

5) 賀田恒夫，石館基　監修：環境変異原性データ集 1，サイエンティスト社，東京，p. 60 (1980).

6) 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試験データ集，社団法人化学物質安全・情報センター，東京，p. 229 (1986).

7) 祖父尼俊雄　監修：染色体異常試験データ集改訂 1998 年版，株式会社エル・アイ・シー，東京，p. 77 (1999).

8) 賀田恒夫，石館基　監修：環境変異原性データ集 1，サイエンティスト社，東京，p. 68 (1980).

9) 祖父尼俊雄　監修：染色体異常試験データ集改訂 1998 年版，株式会社エル・アイ・シー，東京，p. 392 (1999).

10) 祖父尼俊雄　監修：染色体異常試験データ集改訂 1998 年版，株式会社エル・アイ・シー，東京，p. 186 (1999).

11) 賀田恒夫，石館基　監修：環境変異原性データ集 1，サイエンティスト社，東京，p. 329 (1980).

12) 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試験データ集，社団法人化学物質安全・情報センター，東京，p. 196 (1986).

Table 1. Cytotoxicity of 4,4'-biphenyldiol 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	128 114 106 (116 ± 11)	11 13 9 (11 ± 2)	38 32 32 (34 ± 3)		17 21 16 (18 ± 3)	9 10 5 (8 ± 3)
	50.0	121	15	34		21	9
	150	122	9	32		22	10
	500	101	8	21		20	8
	1500 †	37 *	5	8		18	8
	5000 †	0 *	0 *	12		0 *	0 *
S9 mix (+)	0	136 159 116 (137 ± 22)	8 7 6 (7 ± 1)	34 36 45 (38 ± 6)		35 29 24 (29 ± 6)	12 16 16 (15 ± 2)
	50.0	151	10	43		35	18
	150	169	13	34		37	16
	500	141	12	31		19	13
	1500	33 *	5	22		27	10
	5000 †	0 *	0 *	8		0 *	0 *
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2		AF2	9AA
	Dose (μg / plate)	0.01	0.5	0.01		0.1	80
	Number of colonies / plate	488 429 408 (442 ± 41)	553 606 574 (578 ± 27)	161 165 155 (160 ± 5)		430 407 483 (440 ± 39)	356 442 286 (361 ± 78)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA		2AA	2AA
	Dose (μg / plate)	1	2	10		0.5	2
	Number of colonies / plate	752 803 884 (813 ± 67)	365 346 336 (349 ± 15)	961 857 793 (870 ± 85)		422 465 491 (459 ± 35)	217 254 260 (244 ± 23)

The purity of the test substance was 99.96 wt%.

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

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

*: Growth inhibition was observed.

Table 2. Mutagenicity of 4,4'-biphenyldiol 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	153	139	133	10	10	8	18	22	24	22	28	26	7	5	8
		(142 ±		10)	(9 ±		1)	(21 ±		3)	(25 ±		3)	(7 ±		2)
	78.1	152	176	137	NT			NT			NT			NT		
		(155 ±		20)												
	156	137	144	142	11	7	9	24	21	26	24	22	24	9	10	6
		(141 ±		4)	(9 ±		2)	(24 ±		3)	(23 ±		1)	(8 ±		2)
	313	142	136	124	3	8	8	21	22	16	24	27	28	9	8	8
		(134 ±		9)	(6 ±		3)	(20 ±		3)	(26 ±		2)	(8 ±		1)
	625	123	121	132	7	6	6	29	18	21	22	24	27	4	4	6
		(125 ±		6)	(6 ±		1)	(23 ±		6)	(24 ±		3)	(5 ±		1)
	1250	72 *	76 *	101 *	3	6	7	19	16	18	26	17	22	7	6	8
		(83 ±		16)	(5 ±		2)	(18 ±		2)	(22 ±		5)	(7 ±		1)
	2500 †	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	7	9	14	0 *	0 *	0 *	2 *	3 *	3 *
		(0 ±		0)	(0 ±		0)	(10 ±		4)	(0 ±		0)	(3 ±		1)
	5000 †	NT			0 *	0 *	0 *	9	5	12	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
					(0 ±		0)	(9 ±		4)	(0 ±		0)	(0 ±		0)
S9 mix (+)	0	171	161	147	6	14	10	35	30	36	42	41	36	12	16	15
		(160 ±		12)	(10 ±		4)	(34 ±		3)	(40 ±		3)	(14 ±		2)
	78.1	148	171	161	NT			NT			NT			NT		
		(160 ±		12)												
	156	181	185	191	8	9	11	32	30	23	57	35	39	12	7	16
		(186 ±		5)	(9 ±		2)	(28 ±		5)	(44 ±		12)	(12 ±		5)
	313	159	166	162	8	4	7	27	28	23	40	42	40	10	7	11
		(162 ±		4)	(6 ±		2)	(26 ±		3)	(41 ±		1)	(9 ±		2)
	625	133	126	127	10	7	6	20	15	22	46	44	42	11	8	8
		(129 ±		4)	(8 ±		2)	(19 ±		4)	(44 ±		2)	(9 ±		2)
	1250	123 *	117 *	129 *	4	3	4	13	25	13	29	35	29	9	9	7
		(123 ±		6)	(4 ±		1)	(17 ±		7)	(31 ±		3)	(8 ±		1)
	2500 †	10 *	6 *	22 *	2 *	2 *	3 *	6	8	11	2 *	3 *	7 *	5 *	1 *	1 *
		(13 ±		8)	(2 ±		1)	(8 ±		3)	(4 ±		3)	(2 ±		2)
	5000 †	NT			0 *	0 *	0 *	9	8	2	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
					(0 ±		0)	(6 ±		4)	(0 ±		0)	(0 ±		0)
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	574	619	613	646	625	610	165	186	184	336	374	431	224	224	231
		(602 ±		24)	(627 ±		18)	(178 ±		12)	(380 ±		48)	(226 ±		4)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	817	802	845	357	311	346	866	763	760	485	443	394	261	266	276
		(821 ±		22)	(338 ±		24)	(796 ±		60)	(441 ±		46)	(268 ±		8)

The purity of the test substance was 99.96 wt%.

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

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

*: Growth inhibition was observed.

NT: Not tested

Table 3. Mutagenicity of 4,4'-biphenyldiol 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	121	104	128	6	8	11	39	37	46	19	29	21	15	10	11
		(118 ±		12)	(8 ±		3)	(41 ±		5)	(23 ±		5)	(12 ±		3)
	78.1	120	110	105	NT			NT			NT			NT		
		(112 ±		8)												
	156	103	127	113	10	10	8	38	46	48	25	26	29	8	8	6
		(114 ±		12)	(9 ±		1)	(44 ±		5)	(27 ±		2)	(7 ±		1)
	313	104	100	108	9	12	7	36	36	46	29	24	20	8	5	10
		(104 ±		4)	(9 ±		3)	(39 ±		6)	(24 ±		5)	(8 ±		3)
	625	63	74	98	10	2	6	43	41	46	18	28	16	7	11	10
		(78 ±		18)	(6 ±		4)	(43 ±		3)	(21 ±		6)	(9 ±		2)
	1250	37 *	37 *	62 *	3	2	8	32	38	32	22	24	25	5	6	7
		(45 ±		14)	(4 ±		3)	(34 ±		3)	(24 ±		2)	(6 ±		1)
	2500 †	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	34	34	30	3 *	2 *	2 *	1 *	2 *	1 *
		(0 ±		0)	(0 ±		0)	(33 ±		2)	(2 ±		1)	(1 ±		1)
	5000 †	NT			0 *	0 *	0 *	30	23	33	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
					(0 ±		0)	(29 ±		5)	(0 ±		0)	(0 ±		0)
S9 mix (+)	0	134	120	130	5	11	8	50	45	43	36	43	40	13	13	14
		(128 ±		7)	(8 ±		3)	(46 ±		4)	(40 ±		4)	(13 ±		1)
	78.1	168	162	164	NT			NT			NT			NT		
		(165 ±		3)												
	156	154	179	147	14	10	10	43	41	43	50	43	48	16	12	8
		(160 ±		17)	(11 ±		2)	(42 ±		1)	(47 ±		4)	(12 ±		4)
	313	149	164	140	13	8	9	44	43	45	43	35	34	13	9	13
		(151 ±		12)	(10 ±		3)	(44 ±		1)	(37 ±		5)	(12 ±		2)
	625	104	123	130	10	4	13	32	37	39	34	42	30	10	13	10
		(119 ±		13)	(9 ±		5)	(36 ±		4)	(35 ±		6)	(11 ±		2)
	1250	83 *	99 *	110 *	6	6	5	35	33	31	27	28	40	6	11	17
		(97 ±		14)	(6 ±		1)	(33 ±		2)	(32 ±		7)	(11 ±		6)
	2500 †	3 *	3 *	1 *	2 *	2 *	1 *	36	29	22	7 *	9 *	9 *	2 *	1 *	3 *
		(2 ±		1)	(2 ±		1)	(29 ±		7)	(8 ±		1)	(2 ±		1)
	5000 †	NT			0 *	0 *	0 *	31	30	27	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
					(0 ±		0)	(29 ±		2)	(0 ±		0)	(0 ±		0)
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	485	406	403	602	600	601	159	170	200	403	397	466	224	298	416
		(431 ±		47)	(601 ±		1)	(176 ±		21)	(422 ±		38)	(313 ±		97)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	755	755	801	367	319	348	822	712	796	441	444	418	251	234	273
		(770 ±		27)	(345 ±		24)	(777 ±		57)	(434 ±		14)	(253 ±		20)

The purity of the test substance was 99.96 wt%.

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

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

*: Growth inhibition was observed.

NT: Not tested

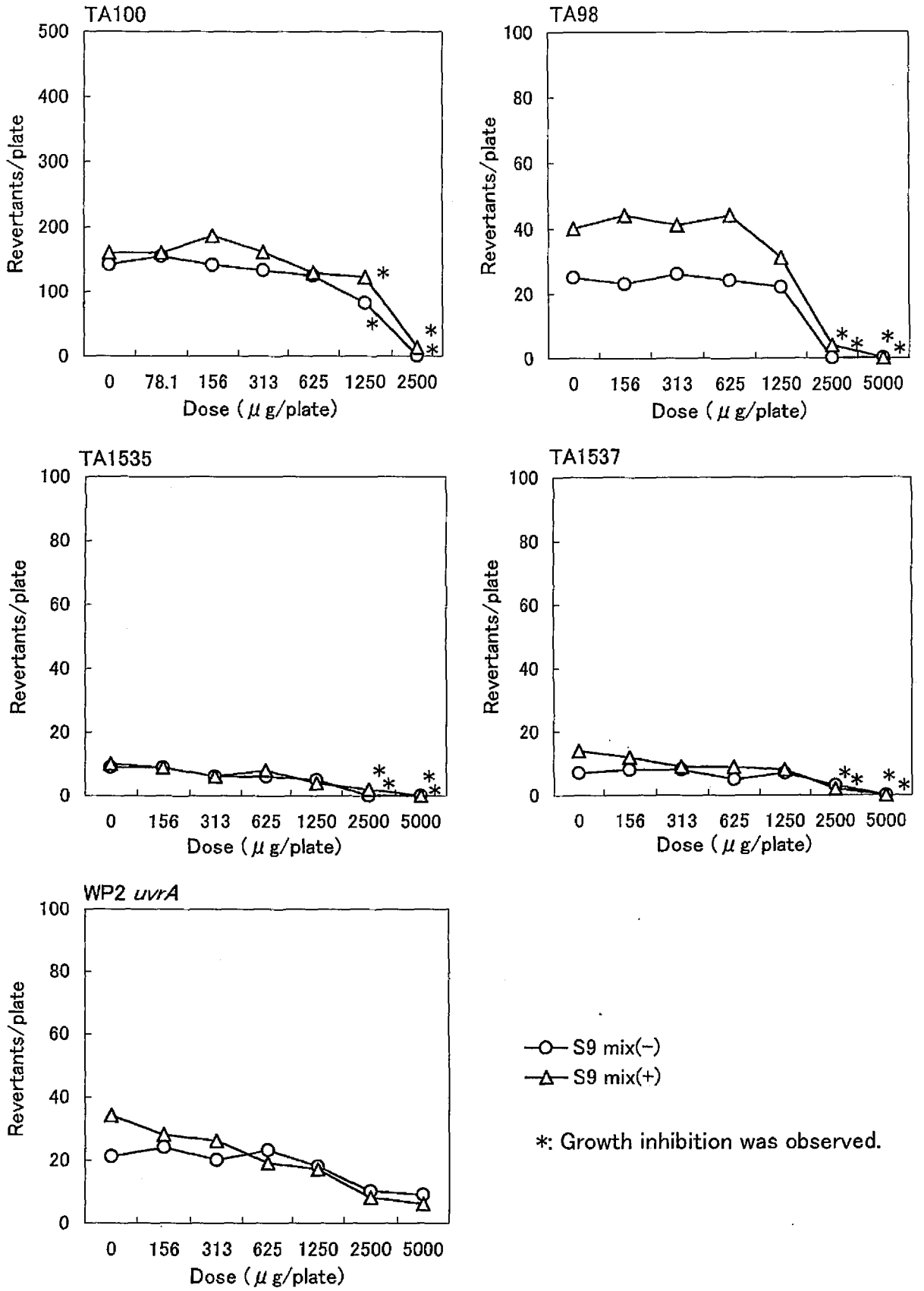

Figure 1. Dose response curves in mutagenicity test (I) of 4,4'-Biphenyldiol in bacteria

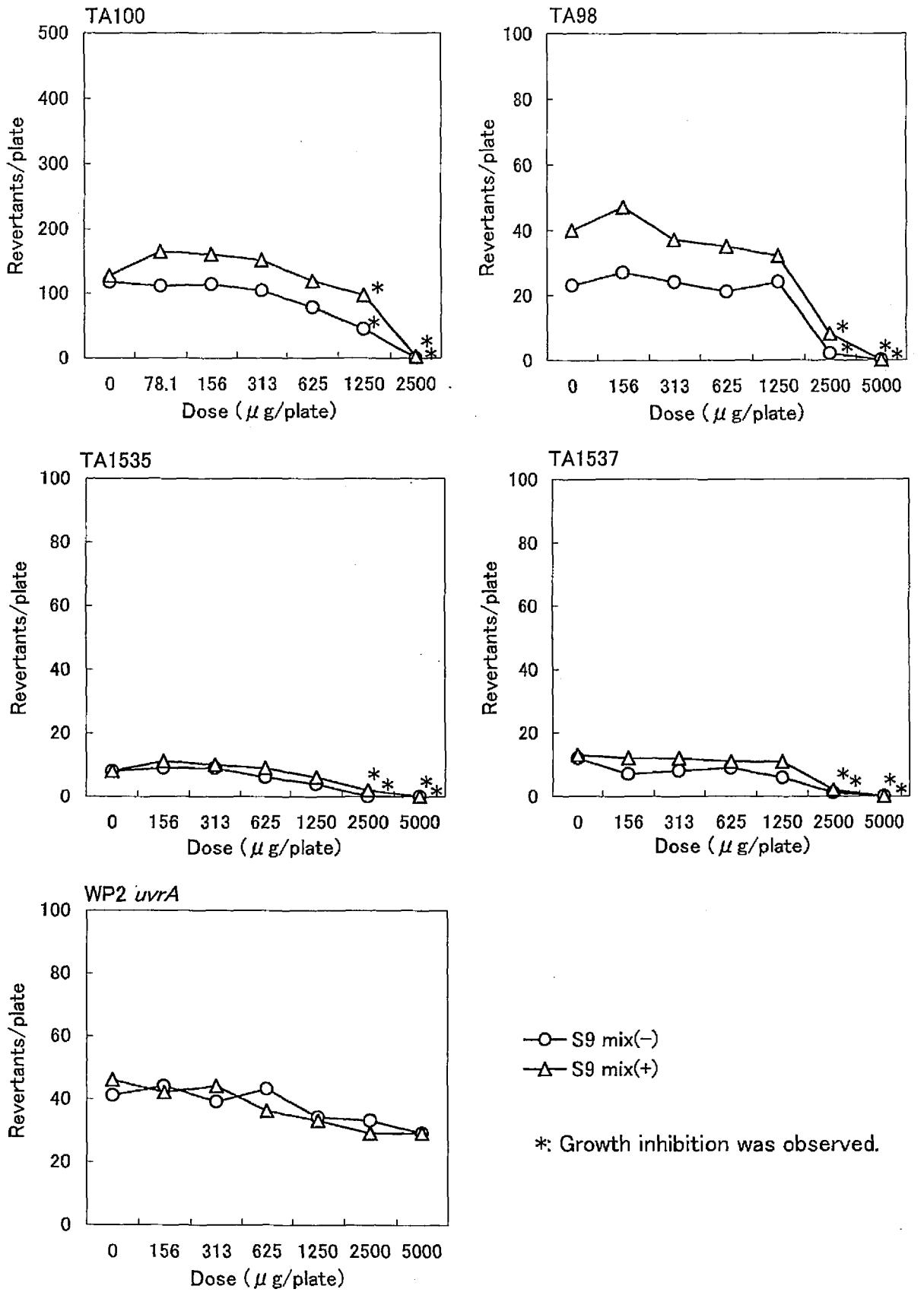

Figure 2. Dose response curves in mutagenicity test (II) of 4,4'-Biphenyldiol in bacteria