

最終報告書

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：4179（115-097）

平成12年7月13日

試験委託者

厚生省 生活衛生局

財団法人

食品農医薬品安全性評価センター

目次

1. 要約.....	3
2. 表題.....	4
3. 試験目的.....	4
11. 被験物質.....	6
12. 試験材料および方法.....	8
13. 試験結果.....	15
14. 考察および結論.....	17
15. 参考文献.....	18

Figures	F-1~7
Figure 1 Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2, 5-dione, 1-phenyl- in strain TA100	F-1
Figure 2 Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2, 5-dione, 1-phenyl- in strain TA1535	F-2
Figure 3 Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2, 5-dione, 1-phenyl- in strain WP2 <i>uvrA</i>	F-3
Figure 4 Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2, 5-dione, 1-phenyl- in strain TA98	F-4
Figure 5 Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2, 5-dione, 1-phenyl- in strain TA1537	F-5
Figure 6 Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2, 5-dione, 1-phenyl- in strain TA98	F-6
Figure 7 Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2, 5-dione, 1-phenyl- in strain TA1537	F-7

Tables		T-1~6
Table 1	Results of the bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- (1st trial) [direct method : -S9]	T-1
Table 2	Results of the bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- (1st trial) [activation method : +S9]	T-2
Table 3	Results of the bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- (2nd trial) [direct method : -S9]	T-3
Table 4	Results of the bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- (2nd trial) [direct method : -S9]	T-4
Table 5	Results of the bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- (2nd trial) [activation method : +S9]	T-5
Table 6	Results of the confirmative examination of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- [direct method : -S9]	T-6

1. 要約

本試験条件下において、1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン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。

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン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 および 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。

その結果、1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン処理では直接法の TA98 および TA1537 で弱いながらも試験用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。

一方、直接法および代謝活性化法での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

2. 表題

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討した。

11. 被験物質

11.1. 被験物質名

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン
 【1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-】

11.2. ロット番号

11.3. 純度

99.2 wt%

11.4. 保管条件

直射日光および高温多湿の場所を避け，密栓して室温保存した。

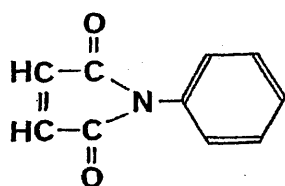
11.5. 別名

N-Phenylmaleimide (PMI)

11.6. CAS 番号

941-69-5

11.7. 構造式又は示性式



11.8. 分子量

173.2

11.9. 不純物の名称及び濃度

2-フェリノ, N-フェニルマレイミド	0.5~0.8%
PMI のポリマー	0.03%

11.10. 常温における性状

黄色固体 (フレーク状)

11.11. 融点

88.7℃

11.12. 沸点

142°C/0.8 kPa

11.13. 溶媒に対する溶解度

水 : 100 ppm 以下

DMSO : 約 50 g/100 mL

アセトン : 約 50 g/100 mL

11.14. 安定性

水に接触すると加水分解する。

11.15. 取り扱い上の注意

吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れないよう適切な保護具を着用した。
粉塵の発生を極力抑え、取り扱い後は容器を密栓した。

11.16. 残余被験物質の処理

被験物質の残余は、染色体異常試験（試験番号 4180）終了後、被験物質提供元に返却する。

12. 試験材料および方法

12.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

- | | | | |
|----|---------|-----------------|---------------------|
| 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日にカリフォルニア大学から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受けた。

平成11年3月31日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO: GC用; Merck KGaA; 純度99.7%以上, Lot No. K24605778 803)を容量比80:7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー(MDF-390AT; 三洋電機メデイカシステム株式会社)に保存(-80°C)した。

12.2. 培地の調製

12.2.1. 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(オリエンタル酵母工業株式会社: 平成11年1月19日製造, Lot No. AN040AO)を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地 E を含む組成の溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示す。

硫酸マグネシウム・7水塩	0.2	g
クエン酸・1水塩	2	g
リン酸二カリウム・無水塩	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
精製水	200	mL
<hr/>		
グルコース	20	g
精製水	100	mL
<hr/>		
寒天 (No.1 ; Oxoid Limited ; Lot No. 802436)	15	g
精製水	700	mL

12.2.2. トップアガー (軟寒天)

塩化ナトリウム 0.5%を含む 0.6%寒天 (Bacto-agar : Difco Laboratories ; Lot No. 120535JD) 水溶液をオートクレーブで滅菌した後、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン (関東化学株式会社 ; Lot No. 412E1389) - 0.5 mmol/L D-ビオチン (関東化学株式会社 ; Lot No. 811S2086) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン (関東化学株式会社 ; Lot No. 608E1385) 水溶液を同じく 1 容量加えた。

12.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No.2 : Oxoid Limited ; Lot No. 028 59365) 培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液を 50 μ L 接種した。培養開始までの間冷却ユニット (ECS-1 : 東京理化学器械株式会社) を用いて 4°C 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) を用い、37°C で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後直ちに使用した。

ATP フォトメーター（ルミテスター K-100：キッコーマン株式会社）を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試験	試験生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
本試験 1 回目	3.99	3.62	4.02	3.30	2.06
本試験 2 回目	3.50	3.61	4.06	3.14	1.96
確認試験	-	-	-	3.18	1.97

12.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix（キッコーマン株式会社；Lot No. FSM-397）を試験に使用した。

12.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種，性，臓器，誘導物質ならびに誘導方法等を以下に示した。

- a. ロット番号 RAA-397
- b. 調製日 平成 11 年 2 月 5 日（誘導物質投与開始後 5 日目）
- c. 使用動物 ラット：Sprague-Dawley 系
- d. 性／週齢 雄／7 週齢
- e. 体重 192～237 g
- f. 臓器 肝臓
- g. 誘導物質 Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF)
- h. 投与量 PB：30 mg/kg 1 回（1 日目），
および 60 mg/kg 3 回（2～4 日目）
投与回数 BF：80 mg/kg 1 回（3 日目）
- i. 投与方法 腹腔内投与
- j. 蛋白含量 25.40 mg/mL

12.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す.

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

12.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に可溶であり, 溶液中で安定であったことから被験物質を DMSO (Lot No. K24605778 830) に溶解させ調製原液とした. この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に希釈した後, 直ちに処理を行った.

モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO を被験物質の調製に使用した.

12.6. 対照群

12.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒で試験した.

12.6.2. 陽性対照

陽性対照として以下の物質を使用した. 各陽性対照物質は DMSO (Lot No. K24605778 803) を用いて溶解し, 500 あるいは 1000 μL ずつ小分けした後, 凍結保存 (-20°C) したものを試験に使用した.

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; 純度 98.0~102.0%; Lot No. PAN0050)
NaN ₃	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. TPR1596)
9-AA	9-アミノアクリジン塩酸塩 (Aldrich Chemical Co., Inc.; 純度 98.0%; Lot No. AQ08326HN)
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. DLH6052)

《直接法》

a. AF-2	0.01	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA100)
b. AF-2	0.1	〃	(ネズミチフス菌：TA98)
c. NaN ₃	0.5	〃	(ネズミチフス菌：TA1535)
d. 9-AA	80	〃	(ネズミチフス菌：TA1537)
e. AF-2	0.01	〃	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i>)

《代謝活性化法》

a. 2-AA	1	μg/プレート	(ネズミチフス菌：TA100)
b. 2-AA	0.5	〃	(ネズミチフス菌：TA98)
c. 2-AA	2	〃	(ネズミチフス菌：TA1535)
d. 2-AA	2	〃	(ネズミチフス菌：TA1537)
e. 2-AA	10	〃	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i>)

なお、これらの試験用量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」に準じて設定した。

12.6.3. 無菌試験

被験物質液（調製原液）ならびに S9 mix について無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100 μL あるいは S9 mix 500 μL にトップアガーをそれぞれ 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37℃の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。

調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

その結果、1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

12.7. 復帰突然変異試験

12.7.1. 試験用量

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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix	復帰突然変異コロニー数				
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
0	-	96	8	17	20	7
19.5	-	80*	16*	25*	10*	4*
78.1	-	47*	0*	8*	3*	0*
313	-	0*	0*	0*	0*	0*
1250	-	0*	0*	0*	0*	0*
0	+	102	12	17	24	7
19.5	+	100	8	22	27	14
78.1	+	76*	0*	13*	8*	4*
313	+	0*	0*	0*	0*	0*
1250	+	0*	0*	0*	0*	0*

*：生育阻害作用

直接法では 19.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量ならびに代謝活性化法の 78.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量では試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。復帰突然変異コロニー数については用量依存性を伴った明確な増加傾向は認められなかった。本結果を基に、本試験においては以下に示した用量を最高用量とし、それぞれ7用量（公比2）を設定した。但し、本試験2回目の場合、陽性反応が認められたことから直接法の TA98 および TA1537 においては 2.62～10.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ （公比1.25）の7用量を設定した。

復帰突然変異試験で用量当たり3枚のプレートを用いた。

試験系	最高用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)				
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
直接法	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
代謝活性化法	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0

直接法の TA98 および TA1537 の変異原性を確認するため、2.62～10.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ （公比1.25）の7用量を用いた確認試験を実施した。

12.7.2. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μ L、次いで直接法の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500 μ L、代謝活性化法の場合、S9 mix を 500 μ L 分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 μ L を加えた後、振盪恒温器 (M-100^N:タイテック株式会社) を用いて 37°C で 20 分間振盪 (プレインキュベーション) した。振盪終了後、トップアガーを 2 mL 添加し、内容を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器を用いて 37°C の条件で 48 時間各プレートを培養した。

再現性を確認するため、本試験を独立して 2 回実施した。

12.7.3. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株 (背景菌) の生育状態について実体顕微鏡 ($\times 60$) を用いて観察した。さらに被験物質の沈殿状態を肉眼で観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計測した。計測に際しては、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) 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。

12.8. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が陰性対照のほぼ 2 倍以上の増加を示し、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。

12.9. 比活性値の算出

変異原性の強さの相対的比較値である比活性 (mg 当たり) を次式を用いて算出した。コロニー数の平均値は四捨五入する以前の値を用いた。

$$\frac{(\text{当該濃度におけるプレートあたりのコロニー数}) - (\text{陰性対照のプレートあたりのコロニー数})}{\text{当該濃度値 (mg)}}$$

13. 試験結果

13.1. 試験結果 (1回目)

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した.

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン処理群の場合, 直接法, 代謝活性化法とも高用量群において試験菌株に対する生育阻害作用が観察された. 復帰突然変異コロニー数は代謝活性化法の場合, 各試験菌株のいずれの用量においても陰性対照と同等の値であったが, 直接法の TA98 および TA1537 では僅かに増加する傾向が認められた.

一方, 陽性対照物質はそれぞれの菌株において, 陰性対照の 2 倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した.

なお, コロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

13.2. 試験結果 (2回目)

試験結果を Figure 1~7 および Table 3~5 に示した.

被験物質処理群の場合, 直接法, 代謝活性化法とも高用量群において試験菌株に対する生育阻害作用が観察された. 復帰突然変異コロニー数については直接法の TA98 および TA1537 において試験用量に依存した増加傾向が認められた.

一方, 陽性対照物質は各試験菌株に対し, 復帰突然変異を顕著に誘発した.

なお, コロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

13.3. 確認試験結果

直接法の TA98 および TA1537 株における復帰突然変異コロニーの増加傾向を再確認するため, 確認試験を実施した.

試験結果を Figure 6, 7 および Table 6 に示した.

いずれの菌株とも復帰突然変異コロニーの明確な増加傾向がみられ, 誘発の極大では陰性対照値の 2 倍を超えていた.

なお, コロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

以上, 2 回繰り返し実施した本試験ならびに確認試験において, 直接法および代謝活性化法の両試験系とも再現性が確認された.

13.4. 比活性

前述の結果から求めた変異原性の強さに関する相対的比較値である比活性 (mg 当たり) は、以下の通りであった。

試験	S9	菌株	試験用量	比活性
本試験 (1 回目)	—	TA1537	5.00 μg /プレート	2533
本試験 (2 回目)	—	TA98	6.40 μg /プレート	4635
	—	TA1537	5.12 μg /プレート	1823
確認試験	—	TA98	6.40 μg /プレート	4427
	—	TA1537	6.40 μg /プレート	2240

14. 考察および結論

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの変異原性、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。

最高用量として試験菌株の生育を阻害する用量まで検討した。その結果、1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン処理群では直接法の TA98 ならびに TA1537 で、弱いながらも用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加傾向が確認された。

変異原性の強さに関する相対的比較値である比活性の最高値は 4635 (直接法, TA98, 6.40 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) と算出され、既知変異原性物質と比較して 1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの変異原性は弱いことを示していた。

また、本被験物質 (1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン) についてはプレート法による Ames 試験で陰性との報告がある¹⁾。類縁体である N,N'-p-Phenylenedimaleimide, N,N'-o-Phenylenedimaleimid ならびに 1-Phenyl-2-pyrrolidione の変異原性に関する報告はなかった。

なお、陰性対照群あるいは陽性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、本試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、本試験条件下において 1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン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。

15. 参考文献

- 1) 大八化学社内データ (生活科学研究所にて試験実施), 1985.

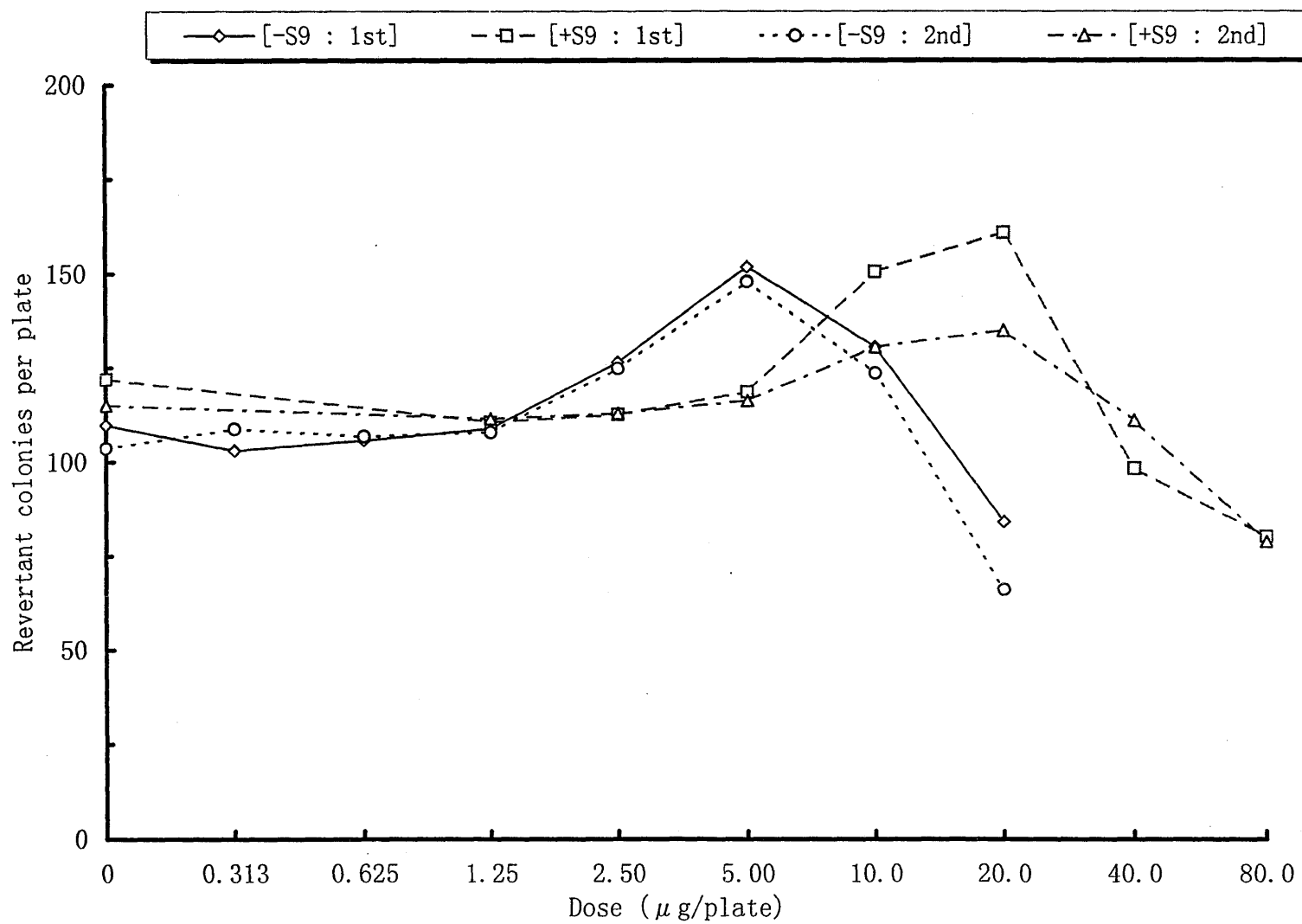


Figure 1. Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- in strain TA100

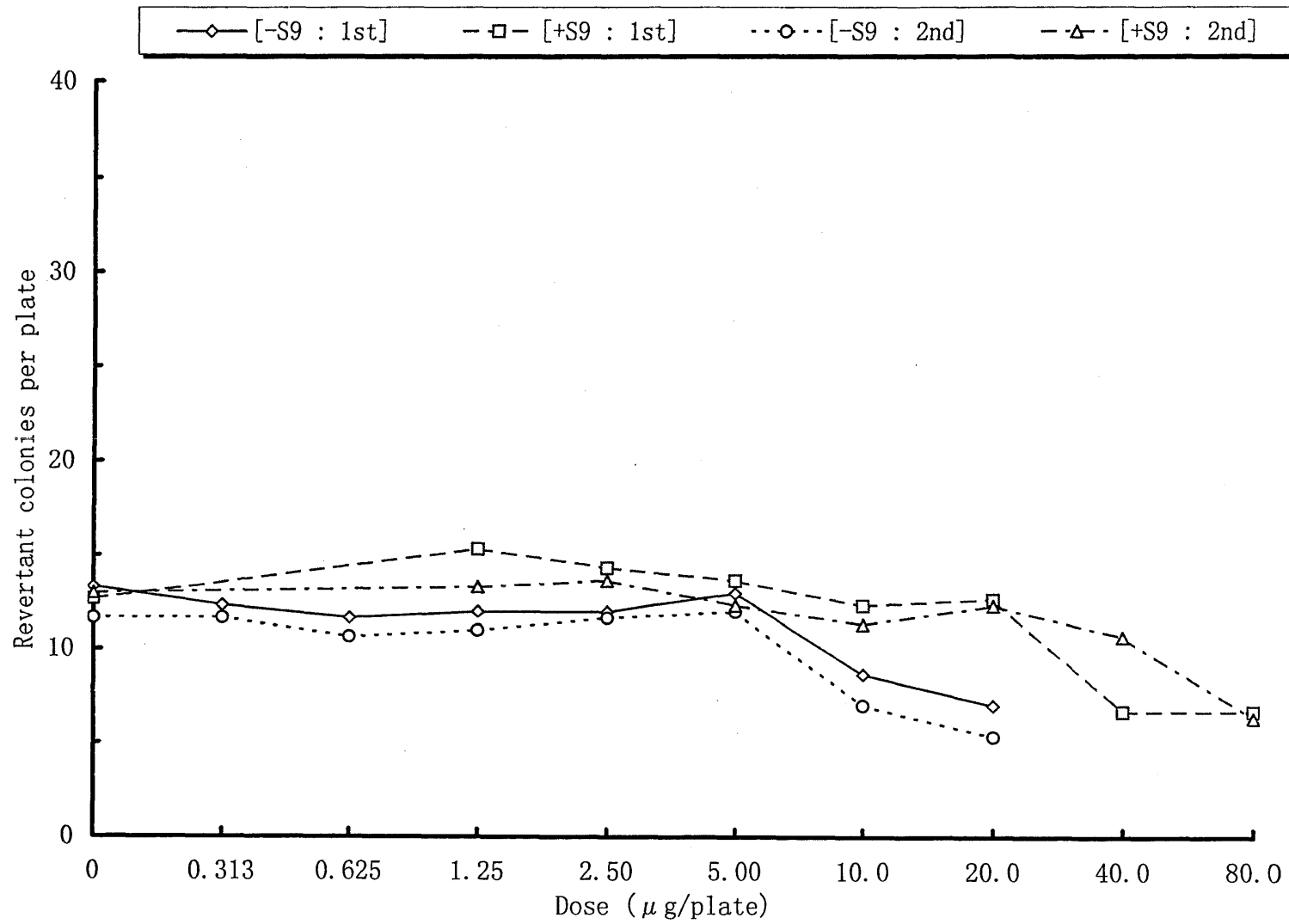


Figure 2. Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- in strain TA1535

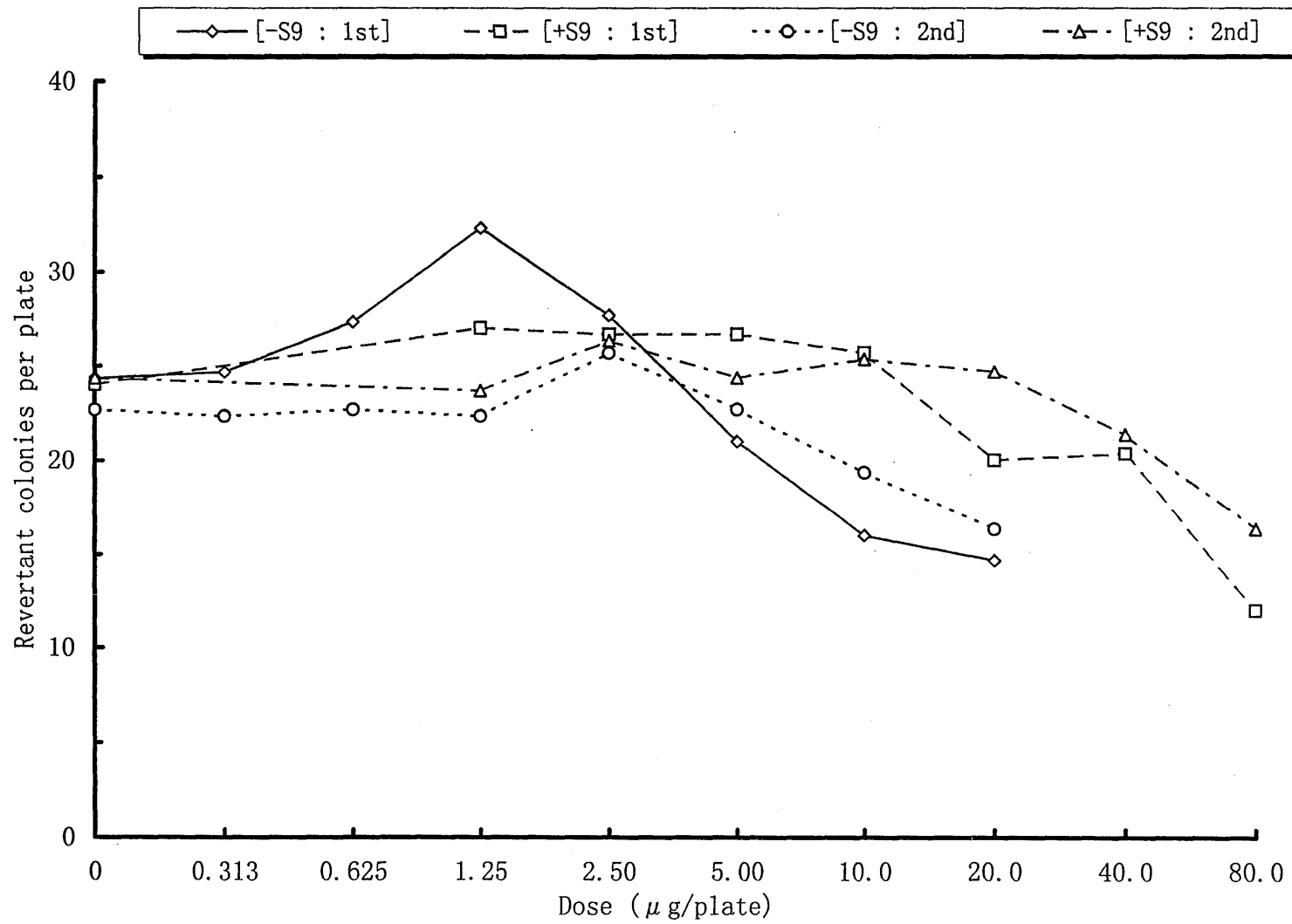


Figure 3. Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- in strain WP2uvrA

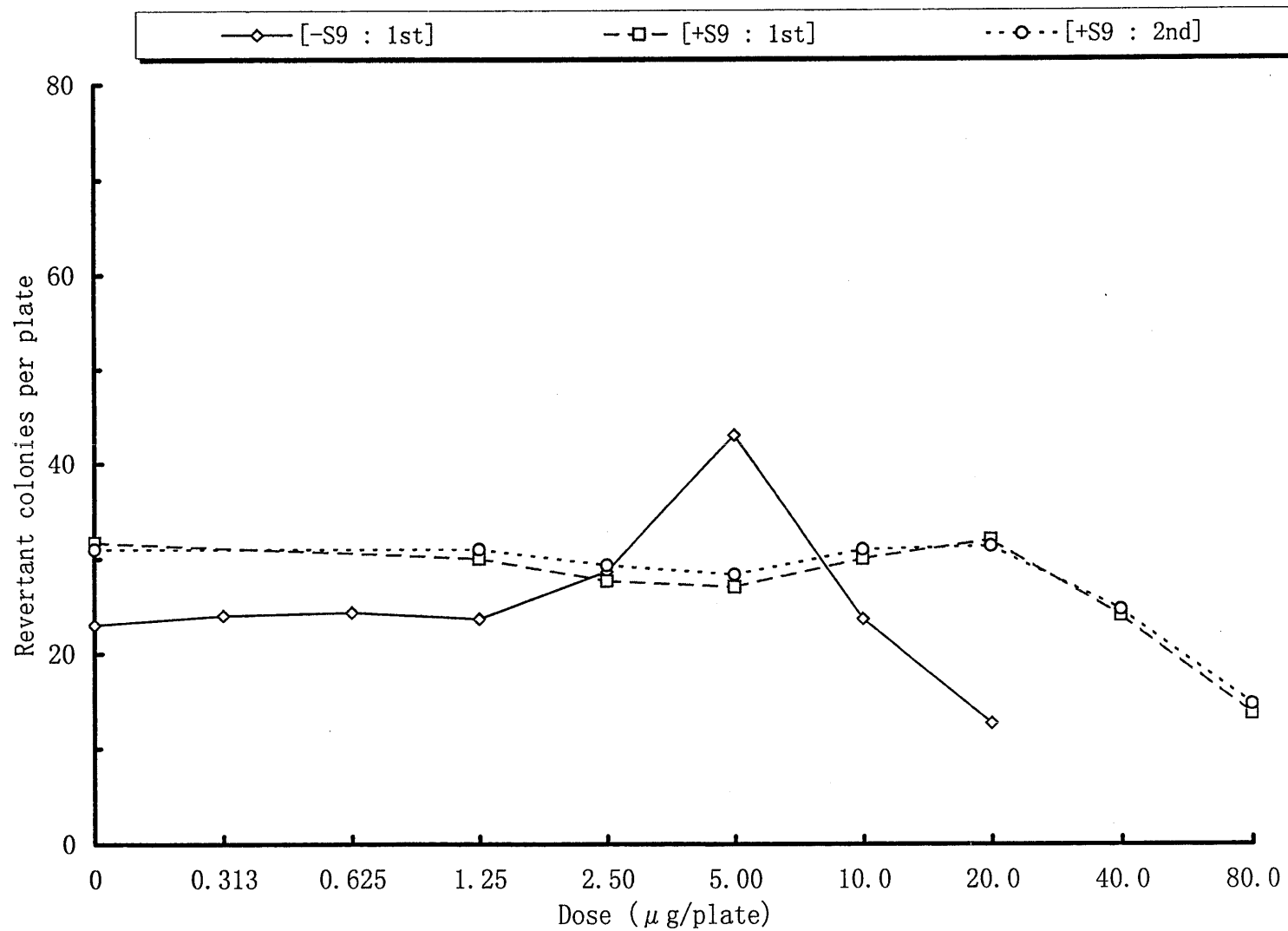


Figure 4. Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- in strain TA98

F-5

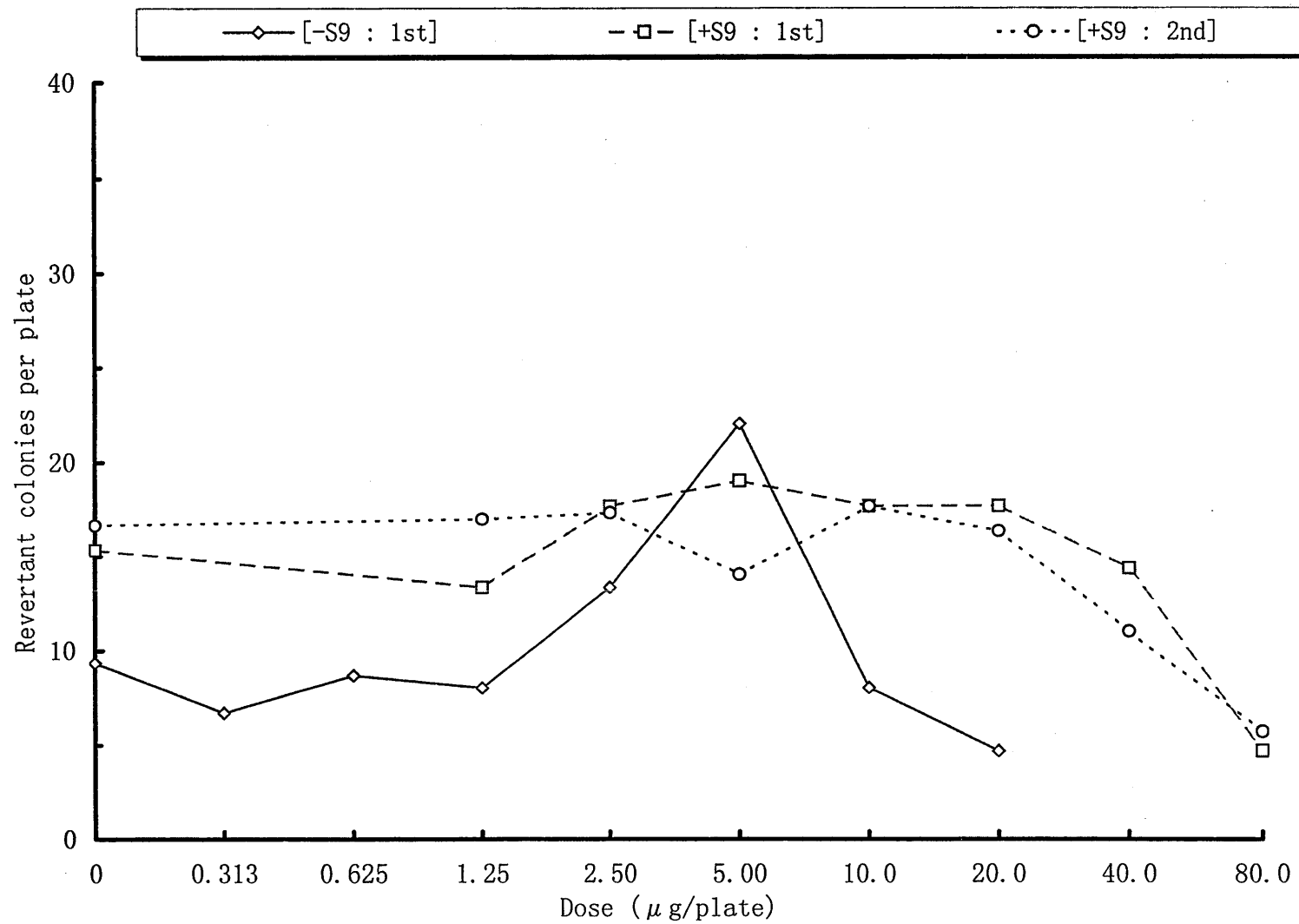


Figure 5. Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- in strain TA1537

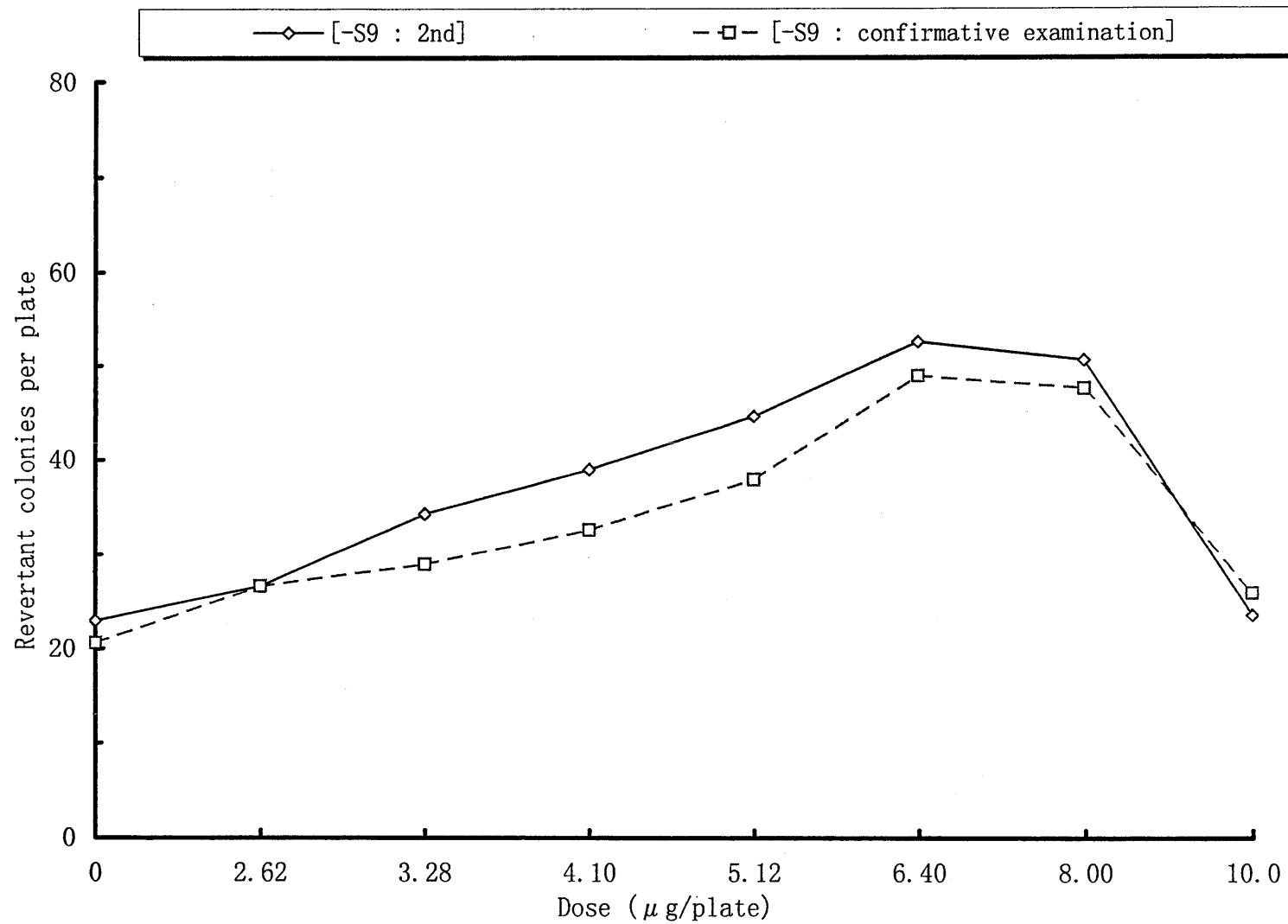


Figure 6. Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- in strain TA98

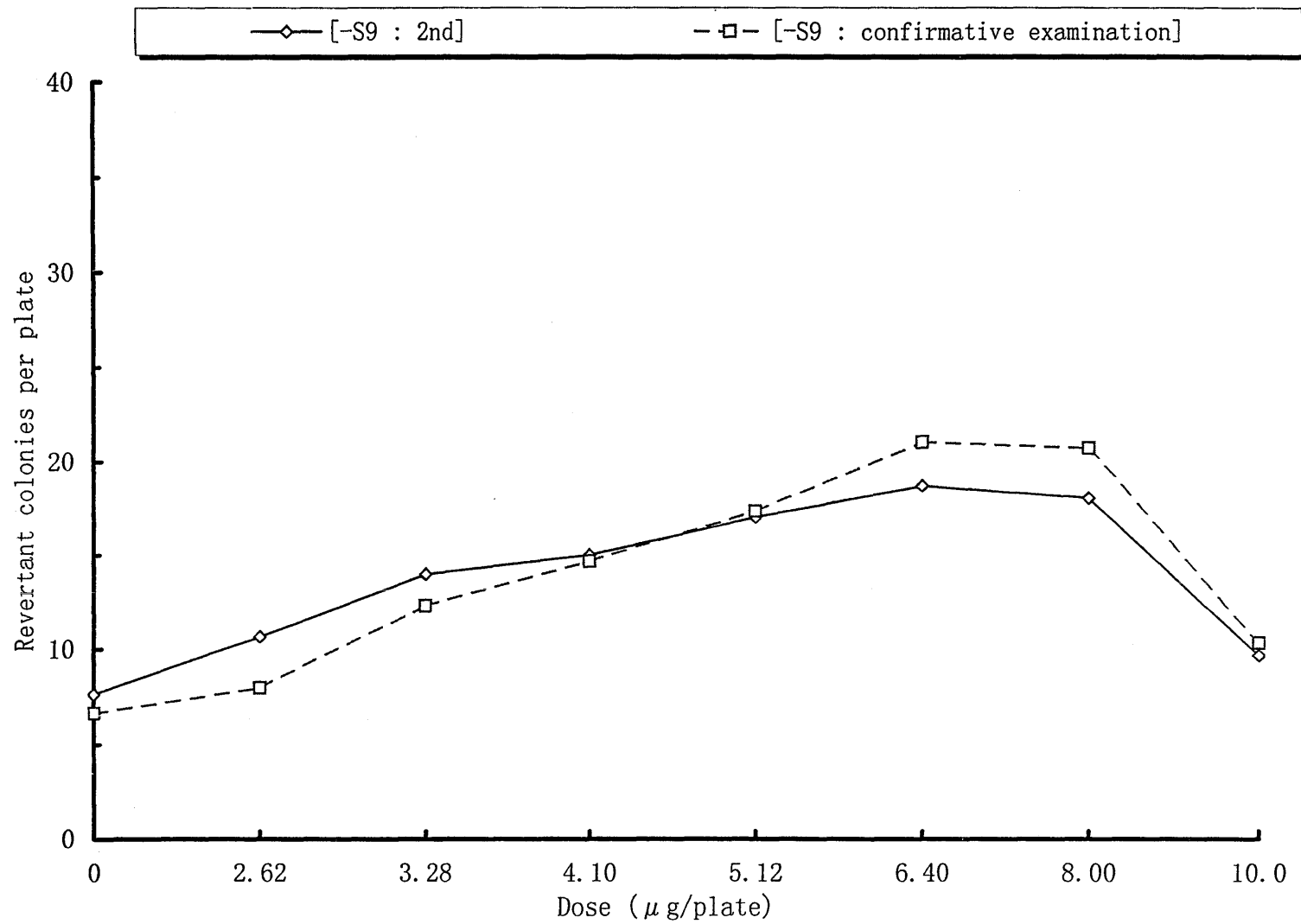


Figure 7. Bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- in strain TA1537

Table 1. Results of the bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- (1st trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	108	111	110	12	13	15	23	25	25	23	20	26	6	9	13
		[110 \pm	2]	[13 \pm	2]	[24 \pm	1]	[23 \pm	3]	[9 \pm	4]					
	0.313	98	105	106	12	14	11	26	23	25	21	26	25	8	6	6
		[103 \pm	4]	[12 \pm	2]	[25 \pm	2]	[24 \pm	3]	[7 \pm	1]					
	0.625	99	110	108	11	12	12	25	32	25	23	26	24	8	11	7
		[106 \pm	6]	[12 \pm	1]	[27 \pm	4]	[24 \pm	2]	[9 \pm	2]					
	1.25	109	102	115	15	11	10	29	31	37	23	23	25	5	9	10
		[109 \pm	7]	[12 \pm	3]	[32 \pm	4]	[24 \pm	1]	[8 \pm	3]					
2.50	131	127	121	10	14	12	25	25	33	26	31	29	15	12	13	
	[126 \pm	5]	[12 \pm	2]	[28 \pm	5]	[29 \pm	3]	[13 \pm	2]						
5.00	157 *	150 *	148 *	14 *	10 *	15 *	21	22	20	41	46	42	19 *	25 *	22 *	
	[152 \pm	5]	[13 \pm	3]	[21 \pm	1]	[43 \pm	3]	[22 \pm	3]						
10.0	132 *	130 *	129 *	7 *	10 *	9 *	14 *	18 *	16 *	21 *	27 *	23 *	8 *	9 *	7 *	
	[130 \pm	2]	[9 \pm	2]	[16 \pm	2]	[24 \pm	3]	[8 \pm	1]						
20.0	80 *	87 *	85 *	5 *	7 *	9 *	13 *	18 *	13 *	13 *	12 *	13 *	5 *	5 *	4 *	
	[84 \pm	4]	[7 \pm	2]	[15 \pm	3]	[13 \pm	1]	[5 \pm	1]						
Positive control		498	490	515 ^{a)}	429	422	416 ^{b)}	144	153	145 ^{a)}	498	499	501 ^{c)}	414	420	443 ^{d)}
		[501 \pm	13]	[422 \pm	7]	[147 \pm	5]	[499 \pm	2]	[426 \pm	15]					

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/plate

c): AF-2, 0.1 μ g/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 2. Results of the bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- (1st trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	119	124	123	13	15	10	21	26	25	33	30	32	13	15	18
		[122 \pm	3]	[13 \pm	3]	[24 \pm	3]	[32 \pm	2]	[15 \pm	3]					
	1.25	109	117	105	14	15	17	26	29	26	31	31	28	13	12	15
		[110 \pm	6]	[15 \pm	2]	[27 \pm	2]	[30 \pm	2]	[13 \pm	2]					
	2.50	110	119	108	15	13	15	28	24	28	25	27	31	16	15	22
		[112 \pm	6]	[14 \pm	1]	[27 \pm	2]	[28 \pm	3]	[18 \pm	4]					
	5.00	118	117	120	11	14	16	26	25	29	26	27	28	18	22	17
		[118 \pm	2]	[14 \pm	3]	[27 \pm	2]	[27 \pm	1]	[19 \pm	3]					
10.0	146	159	146	11	13	13	25	28	24	32	27	31	18	19	16	
	[150 \pm	8]	[12 \pm	1]	[26 \pm	2]	[30 \pm	3]	[18 \pm	2]						
20.0	161	159	162	11 *	14 *	13 *	22	19	19	33	31	32	18 *	15 *	20 *	
	[161 \pm	2]	[13 \pm	2]	[20 \pm	2]	[32 \pm	1]	[18 \pm	3]						
40.0	95 *	102 *	97 *	8 *	8 *	4 *	18 *	22 *	21 *	23 *	26 *	23 *	14 *	15 *	14 *	
	[98 \pm	4]	[7 \pm	2]	[20 \pm	2]	[24 \pm	2]	[14 \pm	1]						
80.0	80 *	74 *	86 *	7 *	5 *	8 *	11 *	11 *	14 *	17 *	14 *	10 *	8 *	2 *	4 *	
	[80 \pm	6]	[7 \pm	2]	[12 \pm	2]	[14 \pm	4]	[5 \pm	3]						
Positive control		960	937	947 ^{a)}	349	330	343 ^{b)}	789	775	778 ^{c)}	485	486	520 ^{d)}	188	171	181 ^{b)}
		[948 \pm	12]	[341 \pm	10]	[781 \pm	7]	[497 \pm	20]	[180 \pm	9]					

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

* : Growth inhibition was observed

Table 3. Results of the bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]										
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98	TA1537
Test substance	0	108	100	103	13	11	11	22	23	23		
		[104 \pm		4]	[12 \pm		1]	[23 \pm		1]		
	0.313	113	102	111	11	14	10	20	25	22		
		[109 \pm		6]	[12 \pm		2]	[22 \pm		3]		
	0.625	101	113	106	9	10	13	21	24	23		
		[107 \pm		6]	[11 \pm		2]	[23 \pm		2]		
	1.25	108	108	107	10	11	12	22	22	23		
		[108 \pm		1]	[11 \pm		1]	[22 \pm		1]		
2.50	118	129	127	10	11	14	23	27	27			
	[125 \pm		6]	[12 \pm		2]	[26 \pm		2]			
5.00	151 *	147 *	145 *	12 *	11 *	13 *	21	24	23			
	[148 \pm		3]	[12 \pm		1]	[23 \pm		2]			
10.0	115 *	127 *	128 *	9 *	6 *	6 *	20 *	19 *	19 *			
	[123 \pm		7]	[7 \pm		2]	[19 \pm		1]			
20.0	64 *	64 *	70 *	6 *	6 *	4 *	15 *	17 *	17 *			
	[66 \pm		3]	[5 \pm		1]	[16 \pm		1]			
Positive control		435	427	430 ^{a)}	412	439	422 ^{b)}	152	139	149 ^{a)}		
		[431 \pm		4]	[424 \pm		14]	[147 \pm		7]		

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate

b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]											
		TA100			TA1535			TA1537					
Test substance	0							21	23	25	7	9	7
								[23 \pm 2]			[8 \pm 1]		
	2.62							24	28	28	9	14	9
								[27 \pm 2]			[11 \pm 3]		
	3.28							33	35	35	13	12	17
								[34 \pm 1]			[14 \pm 3]		
	4.10							40	38	39	14	18	13
								[39 \pm 1]			[15 \pm 3]		
5.12							44	46	44	16 *	17 *	18 *	
							[45 \pm 1]			[17 \pm 1]			
6.40							50 *	55 *	53 *	17 *	18 *	21 *	
							[53 \pm 3]			[19 \pm 2]			
8.00							50 *	49 *	53 *	17 *	19 *	18 *	
							[51 \pm 2]			[18 \pm 1]			
10.0							21 *	25 *	25 *	9 *	12 *	8 *	
							[24 \pm 2]			[10 \pm 2]			
Positive control							543	549	553 ^{c)}	484	465	456 ^{d)}	
							[548 \pm 5]			[468 \pm 14]			

c): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.1 μ g/plate

d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 5. Results of the bacterial reversion test of 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- (2nd trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	112	111	122	12	14	13	25	23	25	30	30	33	15	17	18
		[115 \pm 6]		[13 \pm 1]		[24 \pm 1]		[31 \pm 2]		[17 \pm 2]						
	1.25	112	116	106	12	14	14	26	21	24	28	33	32	19	14	18
		[111 \pm 5]		[13 \pm 1]		[24 \pm 3]		[31 \pm 3]		[17 \pm 3]						
	2.50	113	112	113	12	14	15	25	26	28	28	30	30	17	18	17
		[113 \pm 1]		[14 \pm 2]		[26 \pm 2]		[29 \pm 1]		[17 \pm 1]						
	5.00	114	118	116	11	14	12	26	26	21	30	26	29	16	11	15
		[116 \pm 2]		[12 \pm 2]		[24 \pm 3]		[28 \pm 2]		[14 \pm 3]						
10.0	130	129	132	10	12	12	24	28	24	30	34	29	17	17	19	
	[130 \pm 2]		[11 \pm 1]		[25 \pm 2]		[31 \pm 3]		[18 \pm 1]							
20.0	126	138	140	13 *	13 *	11 *	26	23	25	27 *	33 *	34 *	13 *	18 *	18 *	
	[135 \pm 8]		[12 \pm 1]		[25 \pm 2]		[31 \pm 4]		[16 \pm 3]							
40.0	114 *	106 *	112 *	8 *	11 *	13 *	22 *	19 *	23 *	27 *	24 *	23 *	10 *	11 *	12 *	
	[111 \pm 4]		[11 \pm 3]		[21 \pm 2]		[25 \pm 2]		[11 \pm 1]							
80.0	76 *	78 *	82 *	7 *	7 *	5 *	16 *	17 *	16 *	13 *	14 *	17 *	4 *	8 *	5 *	
	[79 \pm 3]		[6 \pm 1]		[16 \pm 1]		[15 \pm 2]		[6 \pm 2]							
Positive control	864	890	875 ^{a)}	345	342	361 ^{b)}	839	827	825 ^{c)}	482	513	479 ^{d)}	182	170	172 ^{b)}	
	[876 \pm 13]		[349 \pm 10]		[830 \pm 8]		[491 \pm 19]		[175 \pm 6]							

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

* : Growth inhibition was observed

Table 6. Results of the confirmative examination of 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]																	
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537					
Test substance	0							21	20	21				7	8	5			
								[21 \pm		1]				[7 \pm		2]			
	2.62							27	25	28				10	7	7			
								[27 \pm		2]				[8 \pm		2]			
	3.28							31	27	29				9	15	13			
								[29 \pm		2]				[12 \pm		3]			
	4.10							33	34	31				15	14	15			
							[33 \pm		2]				[15 \pm		1]				
5.12							37	41	36				17 *	16 *	19 *				
							[38 \pm		3]				[17 \pm		2]				
6.40							49 *	50 *	48 *				19 *	22 *	22 *				
							[49 \pm		1]				[21 \pm		2]				
8.00							48 *	48 *	47 *				19 *	19 *	24 *				
							[48 \pm		1]				[21 \pm		3]				
10.0							29 *	25 *	24 *				12 *	10 *	9 *				
							[26 \pm		3]				[10 \pm		2]				
Positive control										518	514	534 ^{c)}	484	506	496 ^{d)}				
										[522 \pm		11]	[495 \pm		11]				

c): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.1 μ g/plated): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed