

最終報告書

Indene の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : 9045 (115-196)

平成 18 年 9 月 11 日

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約.....	4
12. 被験物質.....	6
13. 試験材料および方法.....	8
14. 試験結果.....	15
15. 考察および結論.....	16
16. 参考文献.....	17
17. 参考とした資料.....	17
18. 試験関係資料の保存.....	18
19. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書 に従わなかつたこと.....	18
20. 試験責任者の署名および日付.....	18
Figures	
Figure 1 Dose-finding study of indene in strain TA100.....	19
Figure 2 Dose-finding study of indene in strain TA1535.....	20
Figure 3 Dose-finding study of indene in strain WP2 <i>uvrA</i>	21
Figure 4 Dose-finding study of indene in strain TA98.....	22
Figure 5 Dose-finding study of indene in strain TA1537.....	23
Figure 6 Bacterial reverse mutation test of indene in strain TA100.....	24
Figure 7 Bacterial reverse mutation test of indene in strain TA1535.....	25
Figure 8 Bacterial reverse mutation test of indene in strain WP2 <i>uvrA</i>	26
Figure 9 Bacterial reverse mutation test of indene in strain TA98.....	27
Figure 10 Bacterial reverse mutation test of indene in strain TA1537.....	28

Tables

Table 1	Summary data on dose-finding study of indene [Non-activation method: -S9].....	29
Table 2	Summary data on dose-finding study of indene [Activation method: +S9].....	30
Table 3	Summary data on bacterial reverse mutation test of indene [Non-activation method: -S9].....	31
Table 4	Summary data on bacterial reverse mutation test of indene [Activation method: +S9].....	32

1. 要約

当該試験条件下において、Indene には遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

Indene の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 株, TA98 株, TA1535 株および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

Indene 処理では、6.25~5000 µg/プレート of いずれの用量においても、ラット肝マイクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照の2倍を超えるような復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

また、用量設定試験および本試験により、試験結果の再現性が確認された。

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

Indene (インデン)

12.2. ロット番号

12.3. 純度/含量

インデン	96.58%
ベンゾニトリル	1.54%
インダン	0.30%

C4 ベンゼン	0.71%
ウンデカン	0.22%

12.4. 提供元

12.5. 保存条件

冷蔵, 遮光

12.6. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (H-2 : 実測値 3.4~5.3°C, 2005 年 5 月 27 日~2005 年 8 月 6 日 ; 7 号館 2 階被験物質調製室 B 内低温庫 ch. 72 : 実測値 3.2~7.7°C, 2005 年 8 月 6 日~2005 年 8 月 18 日 ; 6 号館 2 階被験物質調製室内バイオマルチクーラーch. 41 : 実測値 4.8~7.7°C, 2005 年 8 月 18 日~2005 年 10 月 3 日)

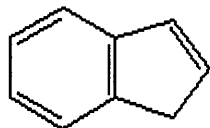
12.7. 化学名

Indene

12.8. CAS No.

95-13-6

12.9. 化学構造



12.10. 分子式

C₉H₈

12.11. 分子量

116.16

12.12. 物質の状態

淡黄色または無色透明の液体

12.13. 沸点

182.6°C

12.14. 融点

-1.6°C

12.15. 溶解性

水に不溶

アルコール, エーテルに可溶

12.16. 安定性

通常取り扱い条件においては安定である.

12.17. 分配係数 (Octanol/Water)

log Pow=2.92

12.18. 蒸気圧

147Pa (25°C)

12.19. 取り扱い上の注意

H₂SO₄+HNO₃でニトロ化する過程で爆発しうる.

過熱すると分解して刺激性の煙とガスを発する.

目に対して, 蒸気・液ともに中等度の刺激性があり, 皮膚に対しても弱い刺激性がある.

12.20. 残余被験物質の処理

実験終了後, 1 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し, 残りは安定性分析のため, 被験物質等管理責任者を介して JFE ケミカル株式会社に返却した. 分析の結果 (2005 年 10 月 6 日付報告), 被験物質が試験期間中安定であったことが確認された.

13. 試験材料および方法

13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において遺伝毒性ガイドラインでは試験菌株が指定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.

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
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)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
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)
大腸菌	WP2uvrA	(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 1983 年 9 月 9 日にカリフォルニア大学 (エイムス教授) から, また, 大腸菌については 1983 年 3 月 16 日に国立衛生試験所 (現 国立医薬品食品衛生研究所) から分与を受けた.

2004 年 9 月 6 日~同年 9 月 9 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, 純度 99.9%, Lot No. K30049278, Merck) 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-U71V, 三洋電機バイオメディカ; 設定値: -80°C , 基準値: -60°C 以下) に保存した.

13.2. 培地の調製

13.2.1. 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 (2005 年 6 月 23 日製造, Lot No. ANI510FU, オリエンタル酵母工業) を試験に使用した. 本プレートは, Vogel-Bonner 最少培地 E を含む溶液 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した.

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
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
D(+) グルコース	20	g
寒天 (BA-30A, Lot No. 41201, 伊那食品工業)	12.0	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー

塩化ナトリウム 0.5 w/v% および寒天 (Bacto-agar, Lot No. 3069265, BD Diagnostic Systems) 0.6 w/v% を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した. 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 (Lot No. 308C2055, 関東化学) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 301C2275, 関東化学) 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 (Lot No. 211D2047, 関東化学) 水溶液を同じく 1 容量加えた.

13.3. 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 w/v% ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. 298714, Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し, これに融解した菌懸濁液を 50 μL 接種した. フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F, タイテック) に設置し, 培養開始までの間, 設定温度 4°C に静置した. その後, 37°C の条件で 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速やかに使用した.

ATP フォトメーター (ルミテスター K-100, キッコーマン) を用い, 試験菌株の生菌

数が 1.0×10^9 /mL以上であることを確認した。生菌数を次の表に示した。

試験	生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	4.36	3.80	3.88	2.91	1.57
本試験	4.46	3.53	4.41	2.85	2.02

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-523, キッコーマン) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C , 基準値: -60°C 以下) に保存した。

13.4.1. 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。

ロット番号	RAA-523
製造年月日	2005 年 6 月 17 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	207~243 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および 投与回数	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)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	26.05 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した。

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

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に易溶であることから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (Lot No. K31758278, Merck) に溶解し、調製原液とした。

用量設定試験では、使用直前に被験物質 400 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 6 mL の DMSO (使用溶媒) を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 8 mL に定容し、調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した。6 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 4 mL を加えることにより 20.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 溶液を調製した。調製後、速やかに使用した。

本試験では、使用直前に被験物質 40 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 8 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 10 mL に定容し、調製原液 (4.00 mg/mL 溶液) を準備した。4 mL の DMSO にこの 4.00 mg/mL 調製原液 4 mL を加えることにより 2.00 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、1.00, 0.500, 0.250, 0.125 および 0.0625 mg/mL 溶液を調製した。調製後、速やかに使用した。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した。

13.6.2. 陽性対照

安評センターにて調製した陽性対照物質溶液 (使用期限: 2007 年 3 月 2 日) を試験に使用した。下記に示す AF-2, 9-AA および 2-AA は、DMSO (Lot No. K31758278, Merck) を用いて調製し、 NaN_3 は、注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. 4B72N, 大塚製薬工場) を用いて調製した。各調製液を 0.5 mL ずつ分注した後、凍結 (設定値: -80°C , 基準値: -60°C 以下) 保存したものを試験に用いた。

AF-2	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (含量 99.5%, Lot No. PKE1831, 和光純薬工業)
NaN_3	アジ化ナトリウム (純度 99.5%, Lot No. KLH1033, 和光純薬工業)
9-AA	9-アミノアクリジン塩酸塩 (純度 99.3%, Lot No. 16323JR, Sigma-Aldrich)
2-AA	2-アミノアントラセン (含量 95.0%, Lot No. KLH1058, 和光純薬工業)

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

	化合物名	調製日	用量 (µg/ プレート)	陽性対照溶液 濃度 (µg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2005.8.3	0.01	0.1
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2005.8.3	0.1	1.0
ネズミチフス菌 TA1535	NaN ₃	2005.8.3	0.5	5.0
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2005.8.3	80	800
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	2005.8.3	0.01	0.1

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	化合物名	調製日	用量 (µg/ プレート)	陽性対照溶液 濃度 (µg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2005.8.3	1.0	10
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2005.8.3	0.5	5.0
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2005.8.3	2.0	20
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2005.8.3	2.0	20
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	2005.8.3	10	100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP」(労働省安全衛生部化学物質調査課編, 1991 年) に準じて設定した。

13.6.3. 無菌試験

被験物質液(調製原液)ならびに S9 mix については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 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C 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。

Indene 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。

13.7. 用量設定試験(予備試験)

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレート を最高用量とし、以下 2000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 および 8.19 µg/プレートの計 8 用量を設定した。

13.7.2. 使用プレート数および識別方法

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて試験菌株, S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを識別した.

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

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, 次いで代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) 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, 代謝活性化系存在下 (+S9 処理) 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懸濁液 100 μ L を加えた後, ウォーターバスシェーカー (M-100^N, タイテック) を用いて 37°C の条件で 20 分間振盪 (120 回/分, プレインキュベーション) した. 振盪終了後, トップアガー 2 mL を添加し, 内容物を混合した. その後, 混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた. 恒温器 (SSV-R11DA, 池田理化) を用い, 各プレートを 37°C の条件で 48 時間培養した. コロニー計測時まで冷蔵で保存した.

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において, 処理開始時およびコロニー数計測時に被験物質析出等の有無を肉眼で観察した.

13.7.5. 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 ($\times 40$) を用いて観察した. 次いで, 復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した. 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) 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.

ただし, 試験菌株に対する強度の生育阻害作用により, -S9 処理, TA100 株, TA1535 株および WP2*uvrA* 株ならびに+S9 処理, TA100 株の 320 μ g/プレートの用量ではコロニーアナライザーの使用は不適切と判断し, 目視にて復帰変異コロニーの計数を実施した.

13.8. 本試験

13.8.1. 用量

用量設定試験の結果, 全ての試験菌株において生育阻害が観察されたが, 変異原性は認められなかった. したがって, 本試験では生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量とし, 次の表に示した7用量を設定した.

《代謝活性化系非存在下: -S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	400
TA1535	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	400
WP2 $uvrA$	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	400
TA98	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	400
TA1537	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	400

《代謝活性化系存在下: +S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	400
TA1535	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	400
WP2 $uvrA$	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	400
TA98	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	400
TA1537	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	400

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた.

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた. ただし, ウォーターバスシェーカーはMM-10 (タイテック) を用いた.

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた.

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた. ただし, 試験菌株に対する強度の生育阻害作用により, -S9 処理, TA1535 株および WP2 $uvrA$ 株ならびに+S9 処理, TA100 株, TA1535 株, TA98 株および TA1537 株の 400 μg/プレートの用量ではコロニーアナライザーの使用は不適切と判断し, 目視にて復帰変異コロニーの計数を実施した.

13.9. 試験成立条件

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は背景データから求めた基準値内であること。陽性対照のコロニー数は同時陰性対照値の2倍を超えること。以上の条件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

13.10. 結果の解析

復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性あるいは再現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。

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した。

Indene 処理の場合、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理および+S9 処理の全ての菌株とも 320 μg /プレート以上の用量において認められた。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

処理開始時に、-S9 処理、+S9 処理とも 800 μg /プレート以上の用量で反応液の白濁がみられ、さらに-S9 処理の 5000 μg /プレートでは白色油滴状の析出物が、+S9 処理の 2000 μg /プレート以上の用量では白色粉末状の析出物が認められた。

コロニー数計測時においては、+S9 処理の 800 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。

14.3. 本試験

結果を Figure 6~10 および Table 3, 4 に示した。

Indene 処理の場合、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用はいずれも高用量群で認められた。

一方、陽性対照物質は、試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.4. 被験物質の析出等 (本試験)

処理開始時に、-S9 処理の 400 μg /プレートの用量で白濁が認められたが、コロニー数計測時においては析出等の変化は観察されなかった。

15. 考察および結論

Indene の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌（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。

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートあるいは試験菌株の生育を阻害する用量まで検討した結果、Indene 処理群では、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照の 2 倍を超えるような復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

用量設定試験および本試験により、これら両処理法とも試験結果の再現性が確認された。

本被験物質 Indene についての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった。

類縁体である 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene については、細菌を用いた復帰突然変異試験で陰性¹⁾、培養細胞を用いた染色体異常試験で陽性²⁾と報告されている。Heptachlor については Rec アッセイで陰性³⁾、復帰突然変異試験で陰性^{4, 5)}、マウス骨髄を用いた染色体異常試験で陽性⁶⁾と報告されている。Chlordane は復帰突然変異試験で陰性⁷⁾、培養細胞を用いたウアバイン耐性試験で、弱いながらも陽性⁸⁾と報告されている。

なお、陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ (Appendix 1) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、Indene の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

16. 参考文献

- 1) 澁谷徹, 原巧, 坂本京子, 川上久美子, 化学物質毒性試験報告書 Vol. 5, 625-629, 1997.
- 2) 田中憲穂, 山影康次, 日下部博一, 中川ゆづき, 水谷正寛, 渡辺美香, 出石由紀, 橋本恵子, 化学物質毒性試験報告書 Vol. 5, 631-634, 1997.
- 3) Shirasu Y., Moriya M., Kato K., Furuhashi A. and Kada T.: Mutagenicity screening in pesticides in the microbial system. *Mutat. Res.* 1976, 40: 19-30.
- 4) Marshall T.C., Dorough H.W. and Swim H.E.: Screening of pesticides for mutagenic potential using *Salmonella typhimurium* mutants. *J. Agric. Food. Chem.* 1981, 24: 560-563.
- 5) Moriya M., Ohta T. Eatanabe K., Miyazawa T., Kato K. and Shirasu Y.: Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay system. *Mutat. Res.* 1983, 116: 185-216.
- 6) Markaryan D.S.: Cytogenetic effect of some chlorinated insecticides on mouse bone-marrow cell nuclei. *Sov. Genet.* 1966, 2: 80-82.
- 7) Simmon V.F., Kauhanen K. and Tardiff R.G.: Mutagenic activity to chemicals identified in drinking water. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 1977, 2: 249-258.
- 8) Ahmed F.E., Lewis N.J. and Hart R.W.: Pesticide induced ouabain resistant mutants in Chinese hamster. *Chem. Biol. Interactions* 1977, 19: 369-374.

-19-

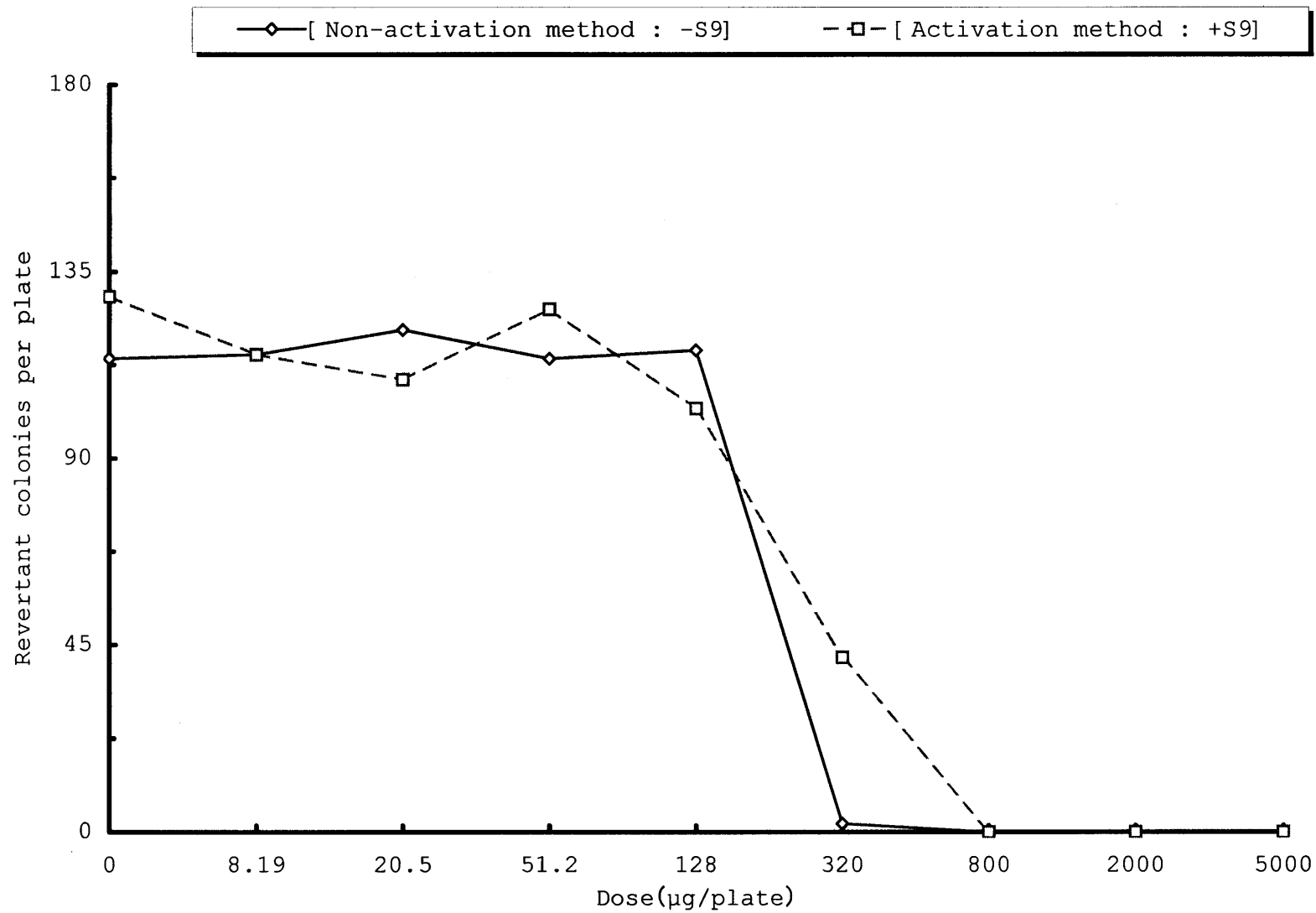


Figure 1. Dose-finding study of indene in strain TA100

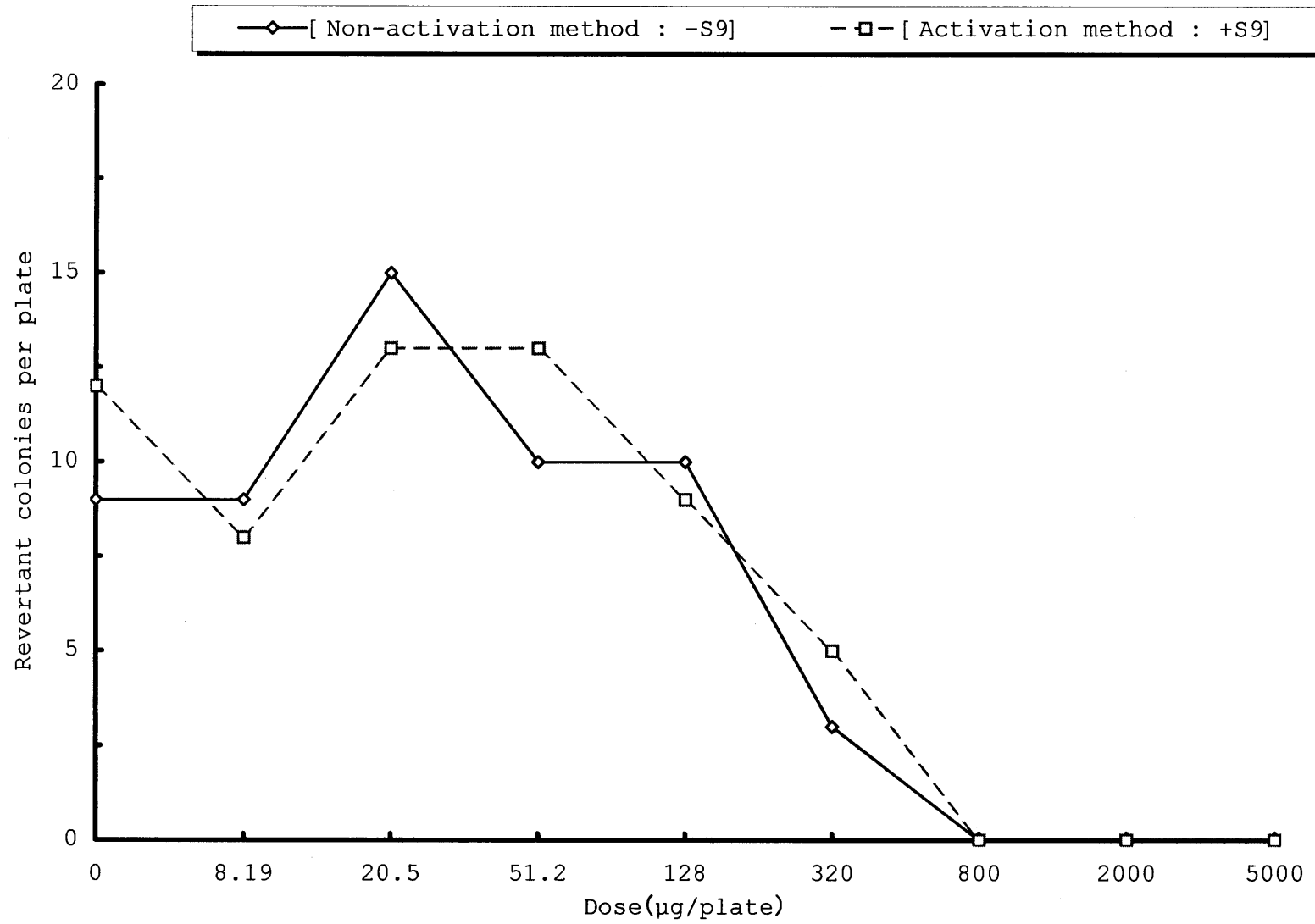


Figure 2. Dose-finding study of indene in strain TA1535

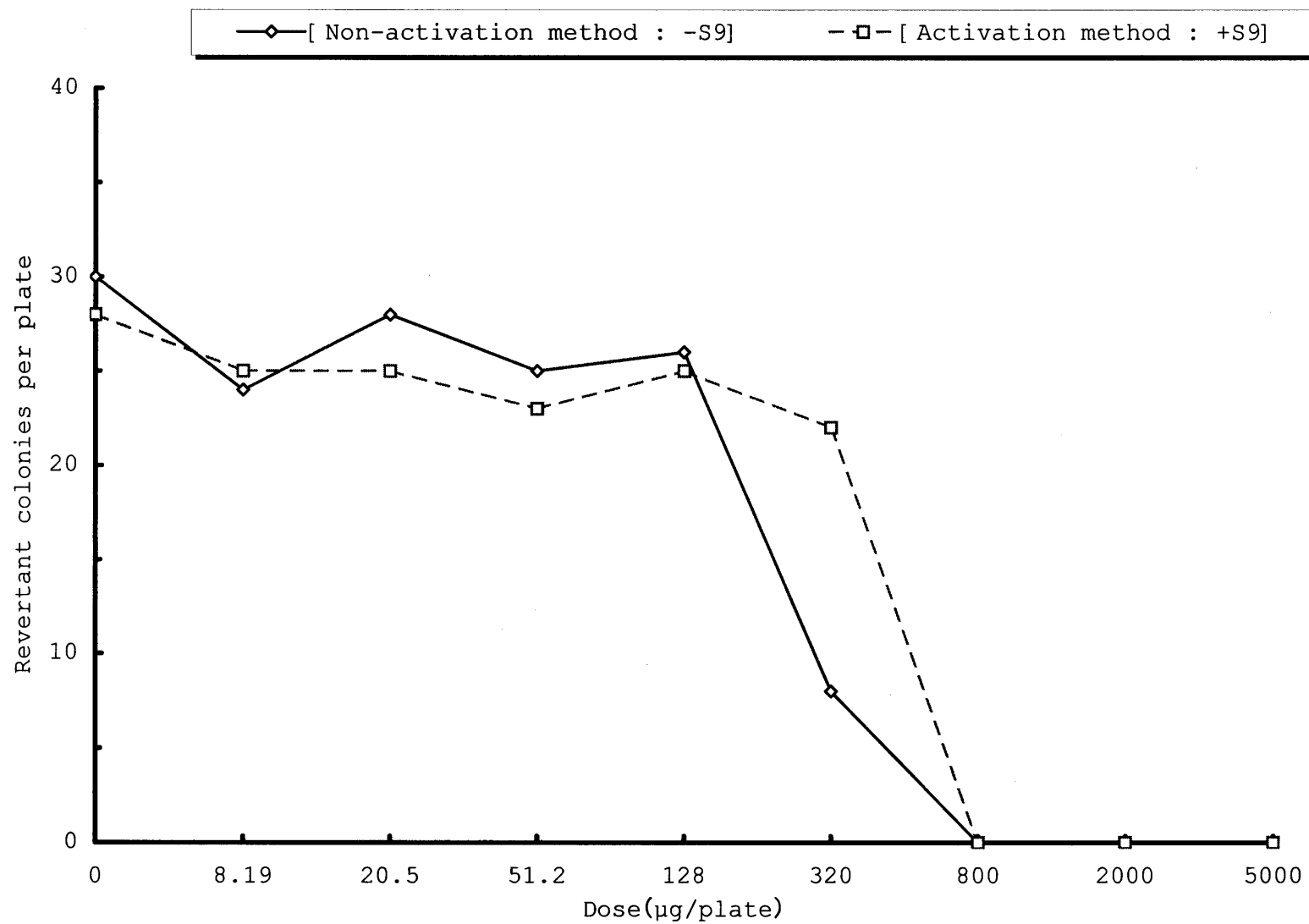


Figure 3. Dose-finding study of indene in strain WP2uvrA

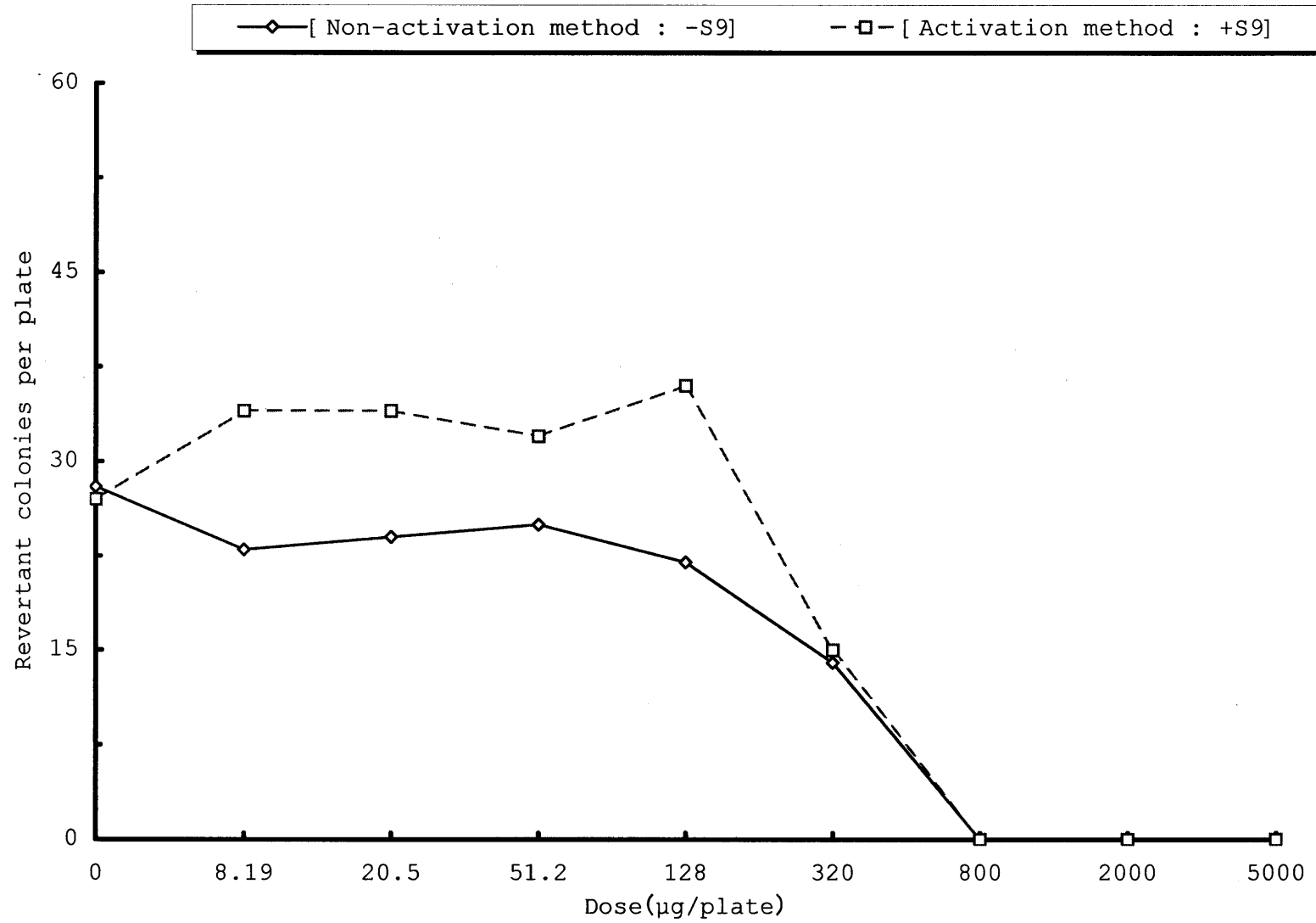


Figure 4. Dose-finding study of indene in strain TA98

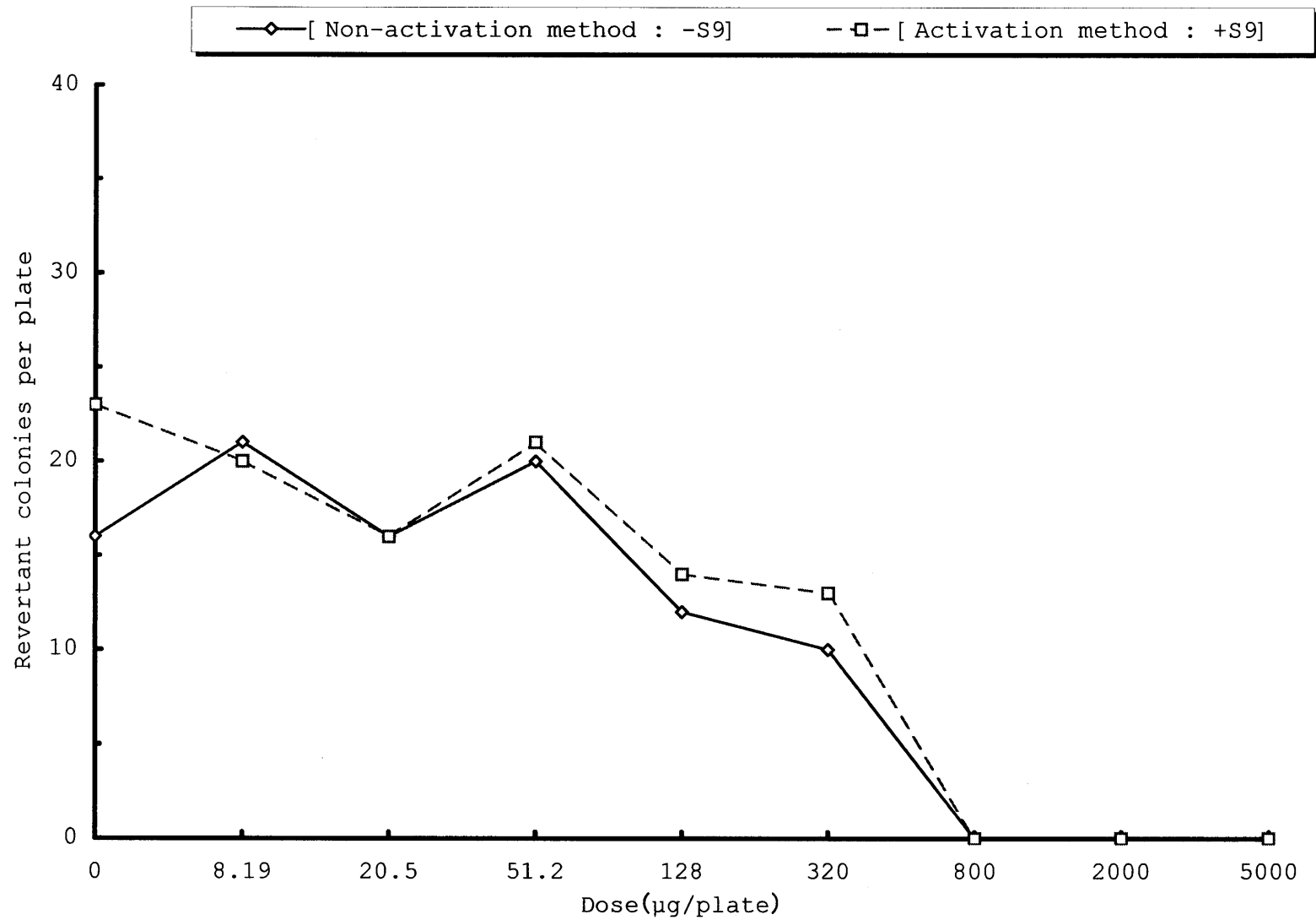


Figure 5. Dose-finding study of indene in strain TA1537

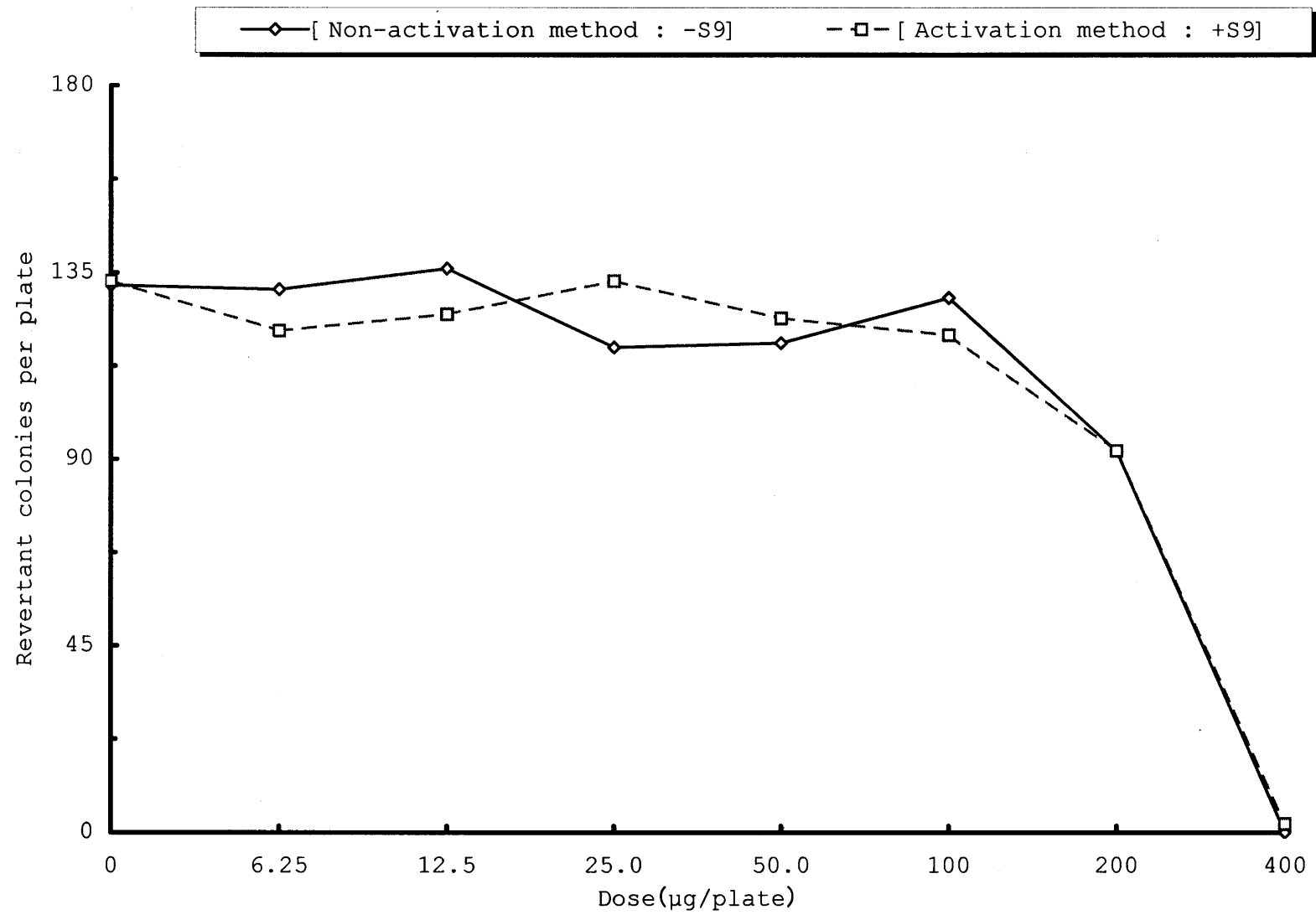


Figure 6. Bacterial reverse mutation test of indene in strain TA100

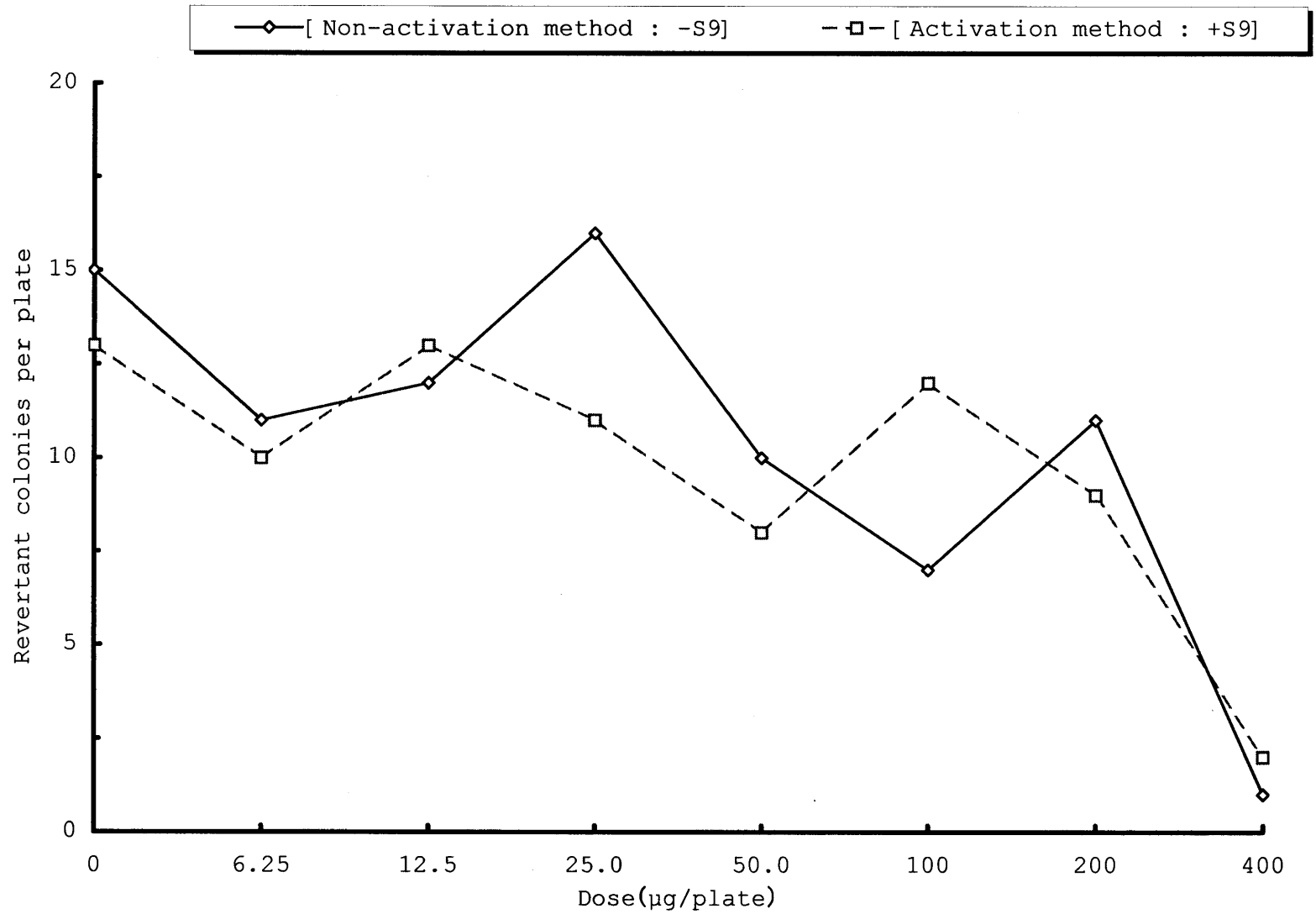


Figure 7. Bacterial reverse mutation test of indene in strain TA1535

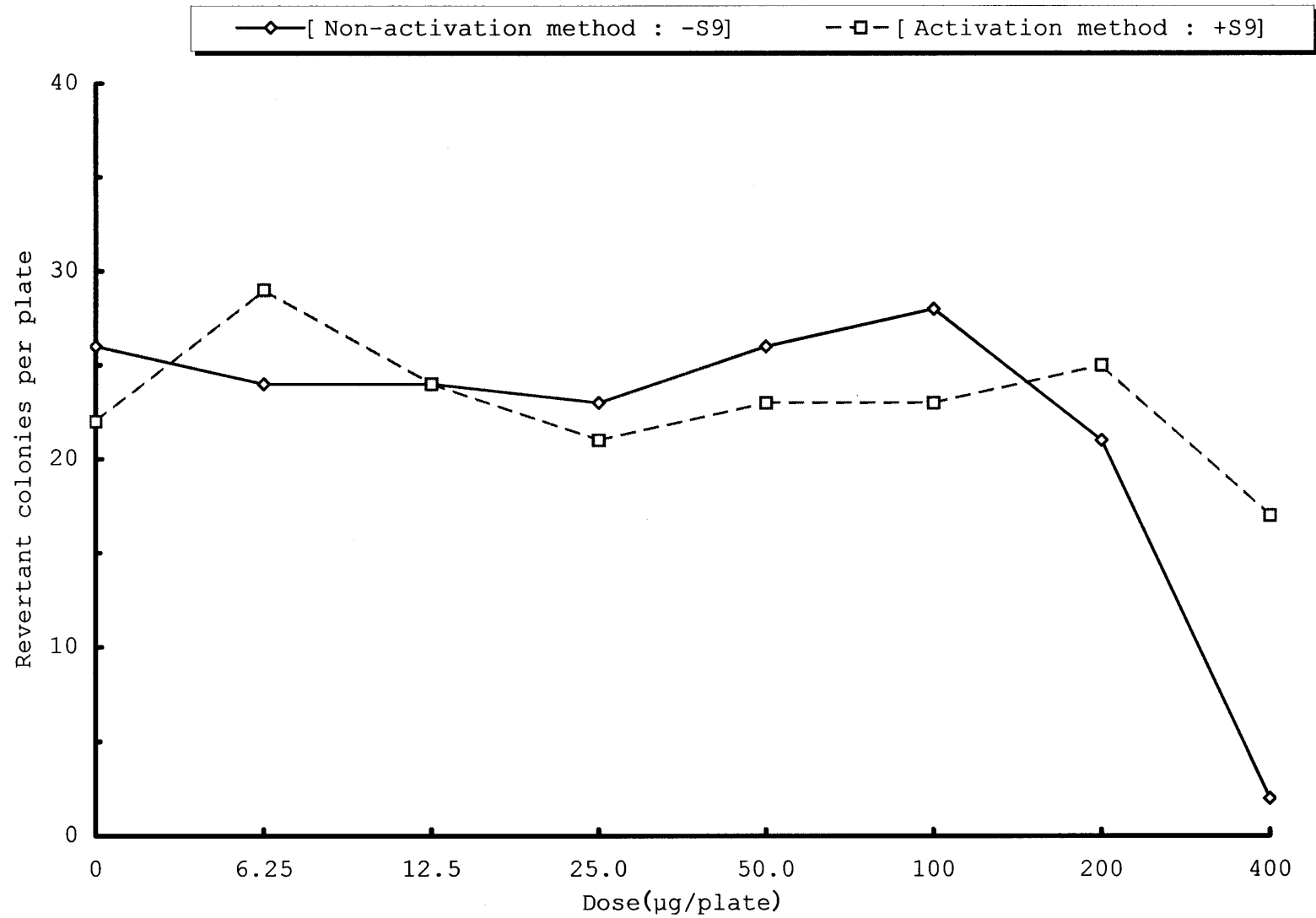


Figure 8. Bacterial reverse mutation test of indene in strain WP2uvrA

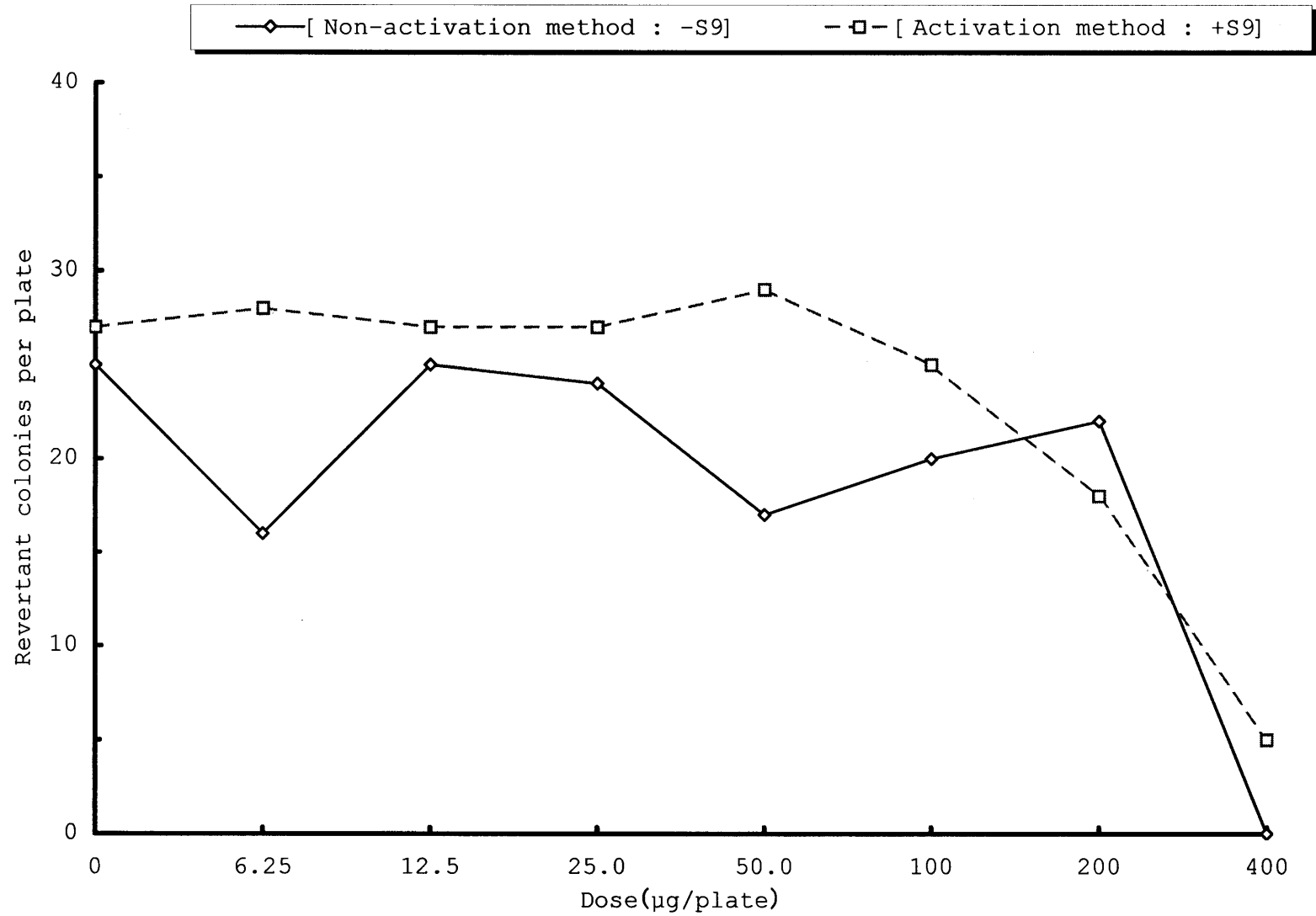


Figure 9. Bacterial reverse mutation test of indene in strain TA98

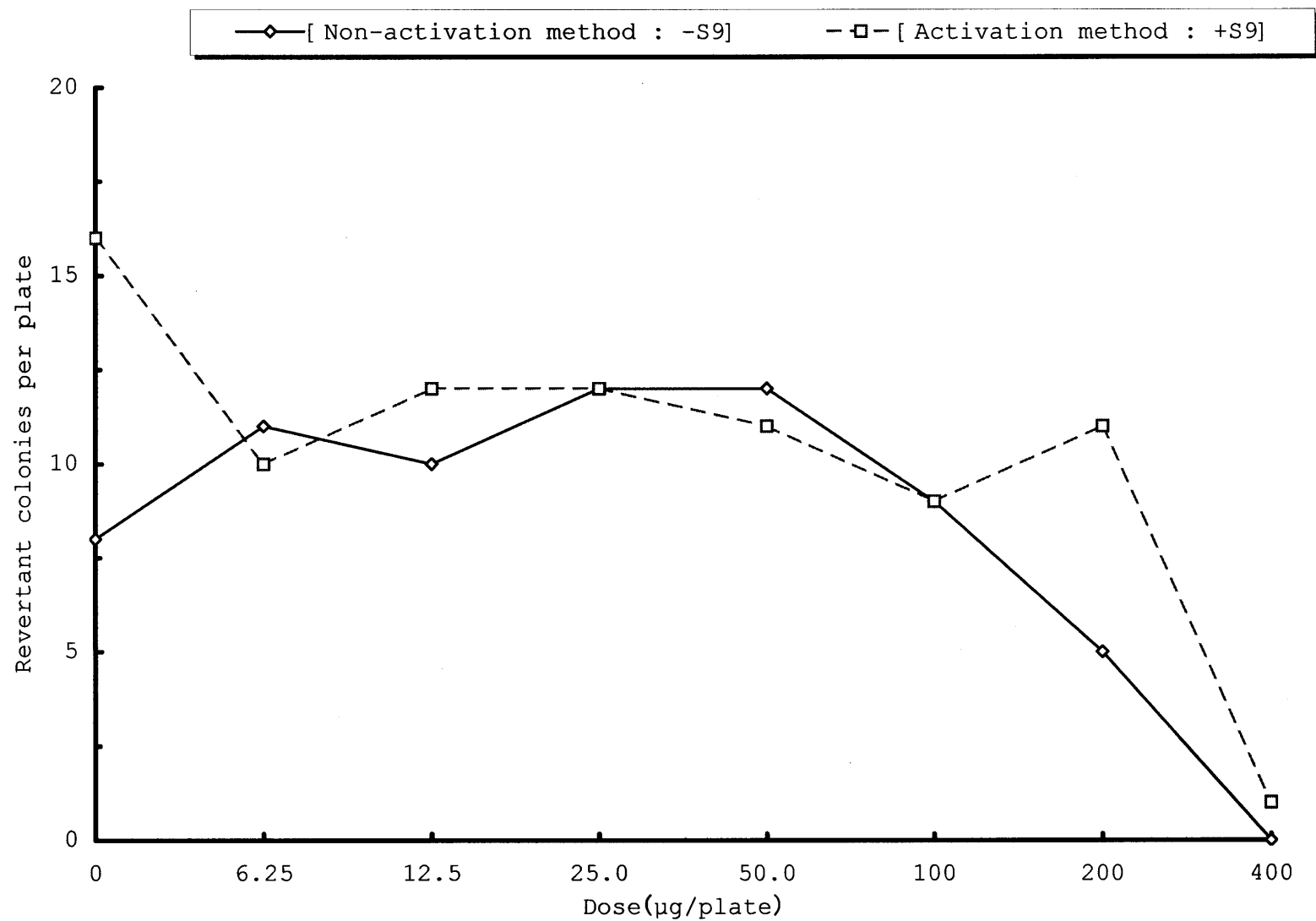


Figure 10. Bacterial reverse mutation test of indene in strain TA1537

Table 1. Summary data on dose-finding study of indene
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Indene	0 a)	111	122	109	5	13	9	31	23	37	31	27	26	19	11	17
		[114	\pm	7]	[9	\pm	4]	[30	\pm	7]	[28	\pm	3]	[16	\pm	4]
	8.19	118	105	122	12	9	7	27	24	20	26	24	20	17	25	20
		[115	\pm	9]	[9	\pm	3]	[24	\pm	4]	[23	\pm	3]	[21	\pm	4]
	20.5	123	114	127	12	16	18	23	35	25	22	28	23	16	11	22
		[121	\pm	7]	[15	\pm	3]	[28	\pm	6]	[24	\pm	3]	[16	\pm	6]
	51.2	124	112	107	8	11	11	27	25	24	30	27	17	15	23	21
		[114	\pm	9]	[10	\pm	2]	[25	\pm	2]	[25	\pm	7]	[20	\pm	4]
128	113	106	129	12	10	8	22	23	32	24	20	23	15	11	11	
	[116	\pm	12]	[10	\pm	2]	[26	\pm	6]	[22	\pm	2]	[12	\pm	2]	
320	3*	2*	1*	3*	5*	1*	5*	6*	13*	7*	17*	18*	11*	11*	7*	
	[2	\pm	1]	[3	\pm	2]	[8	\pm	4]	[14	\pm	6]	[10	\pm	2]	
800	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	
2000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	
5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	
Positive control		938	856	889 b)	614	651	593 c)	169	144	136 b)	661	667	645 d)	274	199	183 e)
		[894	\pm	41]	[619	\pm	29]	[150	\pm	17]	[658	\pm	11]	[219	\pm	49]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

Table 2. Summary data on dose-finding study of indene
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Indene	0 a)	132	117	138	16	9	11	28	31	24	22	32	27	29	17	24
		[129	± 11]	[12	± 4]	[28	± 4]	[27	± 5]	[23	± 6]					
	8.19	121	117	106	8	7	10	23	31	22	36	30	37	27	20	13
		[115	± 8]	[8	± 2]	[25	± 5]	[34	± 4]	[20	± 7]					
	20.5	98	104	124	9	19	12	24	21	31	33	40	30	13	18	16
		[109	± 14]	[13	± 5]	[25	± 5]	[34	± 5]	[16	± 3]					
	51.2	123	139	115	15	11	14	21	28	21	32	31	34	21	25	18
		[126	± 12]	[13	± 2]	[23	± 4]	[32	± 2]	[21	± 4]					
	128	87	103	117	12	6	9	20	32	22	34	40	35	18	10	15
	[102	± 15]	[9	± 3]	[25	± 6]	[36	± 3]	[14	± 4]						
320	12*	49*	66*	7*	3*	6*	26*	23*	17*	17*	11*	18*	10*	16*	13*	
	[42	± 28]	[5	± 2]	[22	± 5]	[15	± 4]	[13	± 3]						
800 +	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]
2000 +	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]
5000 +	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]	[0	± 0]
Positive control		971	983	959 b)	316	270	330 c)	416	404	365 d)	316	316	314 e)	137	144	129 c)
		[971	± 12]	[305	± 31]	[395	± 27]	[315	± 1]	[137	± 8]					

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b):2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 µg/plate c):2-AA, 2 µg/plate d):2-AA, 10 µg/plate e):2-AA, 0.5 µg/plate

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period.

* : Growth inhibition was observed.

Table 3. Summary data on bacterial reverse mutation test of indene
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Indene	0 a)	146	132	117	21	12	12	24	26	27	20	21	33	6	6	11
		[132	±	15]	[15	±	5]	[26	±	2]	[25	±	7]	[8	±	3]
	6.25	113	147	134	14	9	9	26	25	20	23	12	12	9	10	15
		[131	±	17]	[11	±	3]	[24	±	3]	[16	±	6]	[11	±	3]
	12.5	144	129	134	11	19	7	24	27	21	21	29	25	10	10	10
		[136	±	8]	[12	±	6]	[24	±	3]	[25	±	4]	[10	±	0]
	25.0	137	93	122	17	9	23	26	22	22	24	21	27	14	8	13
		[117	±	22]	[16	±	7]	[23	±	2]	[24	±	3]	[12	±	3]
50.0	134	101	120	15	7	9	36	23	20	22	15	14	10	13	12	
	[118	±	17]	[10	±	4]	[26	±	9]	[17	±	4]	[12	±	2]	
100	130	140	116	9	5	6	29	27	27	14	28	19	8	9	9	
	[129	±	12]	[7	±	2]	[28	±	1]	[20	±	7]	[9	±	1]	
200	94 *	99 *	84 *	12 *	5 *	15 *	19 *	24 *	19 *	22 *	24 *	19 *	5 *	5 *	5 *	
	[92	±	8]	[11	±	5]	[21	±	3]	[22	±	3]	[5	±	0]	
400	0 *	0 *	0 *	1 *	1 *	0 *	1 *	2 *	2 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
	[0	±	0]	[1	±	1]	[2	±	1]	[0	±	0]	[0	±	0]	
Positive control		1011	901	919 b)	611	587	589 c)	127	156	146 b)	626	663	651 d)	262	202	255 e)
		[944	±	59]	[596	±	13]	[143	±	15]	[647	±	19]	[240	±	33]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

Table 4. Summary data on bacterial reverse mutation test of indene
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Indene	0 a)	145	135	118	12	12	16	30	14	23	26	28	28	20	13	14
		[133	\pm	14]	[13	\pm	2]	[22	\pm	8]	[27	\pm	1]	[16	\pm	4]
	6.25	121	110	132	14	13	4	27	22	37	28	29	26	12	10	9
		[121	\pm	11]	[10	\pm	6]	[29	\pm	8]	[28	\pm	2]	[10	\pm	2]
	12.5	125	130	120	14	12	12	29	21	23	24	30	27	14	13	8
		[125	\pm	5]	[13	\pm	1]	[24	\pm	4]	[27	\pm	3]	[12	\pm	3]
	25.0	149	118	131	9	12	12	21	17	26	36	20	26	8	17	12
		[133	\pm	16]	[11	\pm	2]	[21	\pm	5]	[27	\pm	8]	[12	\pm	5]
50.0	132	118	122	6	7	11	24	24	20	31	28	28	8	12	12	
	[124	\pm	7]	[8	\pm	3]	[23	\pm	2]	[29	\pm	2]	[11	\pm	2]	
100	104	122	134	4	20	12	23	17	30	27	24	24	10	11	5	
	[120	\pm	15]	[12	\pm	8]	[23	\pm	7]	[25	\pm	2]	[9	\pm	3]	
200	96 *	86 *	94 *	11 *	7 *	9 *	29	17	28	21	20	14	13	11	10	
	[92	\pm	5]	[9	\pm	2]	[25	\pm	7]	[18	\pm	4]	[11	\pm	2]	
400	1 *	3 *	2 *	2 *	3 *	0 *	13 *	20 *	18 *	0 *	14 *	1 *	1 *	2 *	1 *	
	[2	\pm	1]	[2	\pm	2]	[17	\pm	4]	[5	\pm	8]	[1	\pm	1]	
Positive control		1033	990	1034 b)	299	353	328 c)	455	466	431 d)	441	434	435 e)	145	166	187 c)
		[1019	\pm	25]	[327	\pm	27]	[451	\pm	18]	[437	\pm	4]	[166	\pm	21]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b):2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c):2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d):2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e):2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.