

最終報告書

表 題：アジピン酸ジヒドラジドの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：S R 0 5 3 9 3

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表紙	1
目次	4
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	17
考察	18

Tables

Table 1	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-finding test) (SR05393)	20
Table 2	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-finding test) (SR05393)	21
Table 3	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (main test) (SR05393)	22
Table 4	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (main test) (SR05393)	23

Figures

Figure 1-1	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05393) ······	24
Figure 1-2	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05393) ······	25
Figure 2-1	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05393) ······	26
Figure 2-2	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05393) ······	27
Figure 3-1	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-response curves) (SR05393) ······	28
Figure 3-2	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-response curves) (SR05393) ······	29
Figure 4-1	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05393) ······	30
Figure 4-2	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05393) ······	31
Figure 5-1	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05393) ······	32
Figure 5-2	Reverse mutation test of adipic dihydrazide in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05393) ······	33

要 約

アジピン酸ジヒドラジドの細菌における遺伝子突然変異誘発性を検討する目的で、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験を実施した。試験は代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法で実施した。

用量設定試験では、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で低下させた計 7 用量(5~5000 µg/plate)の試験群を設定した。試験の結果、各試験系列のいずれの菌株においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出ならびに生育阻害は、各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

本試験では、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 5 用量(313~5000 µg/plate)の試験群を設定した。試験の結果、各試験系列のいずれの菌株においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出ならびに生育阻害は、各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、それぞれにおける陰性対照群の値の 2 倍以上の明確な増加を示した。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、アジピン酸ジヒドラジドは、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

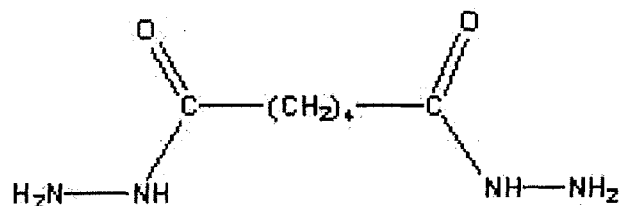
緒 言

アジピン酸ジヒドラジドの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法で実施した。

材料および方法

1. 被験物質

名称	: アジピン酸ジヒドラジド
英名	: Adipic dihydrazide
CAS No.	: 1071-93-8
官報公示整理番号	: 2-865
構造式	:



分子式	: C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂
分子量	: 174.20
物理化学的性質	: 形状 ; 固体
	外観 ; 粉末
	色 ; 白色
	融点 ; 180.5℃
	溶解性 ; 水に溶解する。
	熱水溶状 ; 澄明

純度 : 99.9% (臭素法) (Appendix 1)
 不純物の名称およびその濃度 : 不明 (不純物の特定は実施していない)

入手量 : 25 g (関連試験と共通)
 安定性 : 実験終了後に、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し被験物質の安定性について確認した (Appendix 2)。
 保存場所 : 検体保存室および変異原性試験室
 保存条件 : 冷蔵 (実測範囲 ; 2~8℃)、暗所
 保存期間 : 2006 年 10 月 27 日 (受入) ~ 2007 年 3 月 7 日 (最終使用日)
 取扱上の注意 : ゴム手袋およびマスク等を着用し、皮膚との接触を避けた。着衣等に付着しないように注意した。
 残余被験物質の処置 : 試験操作終了後、純度分析のため製造者へ送付した。

2. 被験物質の調製

被験物質は構造式より水に可溶と判断されたため、日本薬局方注射用水を調製溶媒に選択した。

用量設定試験では、被験物質を精秤し、日本薬局方注射用水を用いて溶解し 50 mg/mL 調製液を調製した。さらに、50 mg/mL 調製液から日本薬局方注射用水を用いて公比約 3 で段階希釈し 15、5、1.5、0.5、0.15 および 0.05 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では、50 mg/mL 調製液を調製し、50 mg/mL 調製液から日本薬局方注射用水を用いて公比 2 で段階希釈し 25、12.5、6.25 および 3.13 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、用量設定試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性 (変色、発熱、発泡等) はみられなかった。

被験物質調製液は、用量設定試験は調製後 2.3 時間以内に、本試験は調製後 2.1 時間以内に試験に使用した。

調製液はクリーンベンチ内で用時に調製し、調製に際してはマスクおよび手袋を着用し、吸引したり皮膚に触れないようにして取扱った。残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体である日本薬局方注射用水 (ロット番号 5D73、株式会社大塚製薬工場) を原液のまま使用した。

4. 陽性対照物質およびその調製

陽性対照物質として、次表の既知変異原物質を使用した。これらの陽性対照物質は、遮光および冷所(2～8℃設定)で保存した。

陽性対照物質は、含量補正をせずにそれぞれ次表の濃度に調製し、分注後-20℃以下で凍結保存したものを解凍後 2.0 時間以内に使用した。調製液は、調製日より 4 ヶ月以内(使用期限：調製後 1 年)に使用した。

陽性対照物質	調製濃度	調製媒体
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(含量 98.3%) ロット番号 SDJ4376 和光純薬工業株式会社	0.1 および 1 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 TA026 株式会社同仁化学研究所
アジ化ナトリウム(純度 99.8%) ロット番号 SDH6348 和光純薬工業株式会社	5 µg/mL	日本薬局方注射用水 ロット番号 5D73 株式会社大塚製薬工場
9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物 (含量 98.8%) ロット番号 03024JR Aldrich Chemical Company, Inc.	800 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 TA026 株式会社同仁化学研究所
2-アミノアントラセン (含量 97.4%) ロット番号 TCG4316 和光純薬工業株式会社	5、10、20 および 100 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 TA026 株式会社同仁化学研究所

5. 試験菌株

試験には、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 ならびに *Escherichia coli* WP2uvrA を使用した。これらの菌株は、1991 年 10 月 18 日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)より分与された。また、これらの菌株は遺伝毒性を有する化学物質の検索に適した細菌として広く受け入れられていることから選択した。

各菌株は、培養液 8 mL に対しジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所)0.7 mL を加え、試験チューブに分注後-80℃以下で凍結保存した。各菌株の培養液の一部を用いて、菌株の特性(アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、紫外線感受性および薬剤耐性)ならびに陰性対照物質および陽性対照物質に対する感受性の検査を行い、これらの特性が正常に保持されていることが確認された菌株を試験に使用した。

6. 培地

(1) 前培養用培地

前培養用のニュートリエントブロス培地として、ニュートリエントブロス (OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号 298714、OXOID LTD.) を日本薬局方注射用水 (ロット番号 6C97 または 6J92、株式会社大塚製薬工場) を用いて 25 g/L に調製した。*S. typhimurium* TA98 および TA100 の培地には、使用時にアンピシリンナトリウム (ロット番号 M3F9025、ナカライテスク株式会社) を 25 µg/mL となるように添加した。

(2) 試験用培地 (最少グルコース寒天培地)

試験用培地として使用した最少グルコース寒天培地 (バイタルメディア AMT-0 培地、ロット番号 DZL7A501 (2006 年 10 月 5 日製造) 極東製薬工業株式会社) 1000 mL 中の組成は次表の通りである。

試験用培地 1000 mL 中の組成	
硫酸マグネシウム・7 水塩	0.2 g
クエン酸・1 水塩	2.0 g
リン酸二カリウム・無水塩	10.0 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
ブドウ糖	20.0 g
寒天末 [OXOID AGAR No. 1、ロット番号 911885-02]	15.0 g

(3) 重層用培地

次表の組成のソフトアガーおよびアミノ酸溶液を蒸留水を用いて調製し、使用時に (A) : (B) = 10 : 1 の容量比で混合した。*S. typhimurium* には L-ヒスチジンおよび D-ビオチンのアミノ酸溶液を、*E. coli* には L-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。

重層用培地の組成	
(A) ソフトアガー	
Bacto™ Agar	0.6 %
(ロット番号 5123150、Becton, Dickinson and Company)	
塩化ナトリウム	0.5 %
(ロット番号 611F1714、関東化学株式会社)	
(B) アミノ酸溶液	
L-ヒスチジンおよび D-ビオチン溶液	各々 0.5 mmol/L
(L-ヒスチジン、ロット番号 ASP6644、和光純薬工業株式会社)	
(D-ビオチン、ロット番号 LTM1077、和光純薬工業株式会社)	
または	
L-トリプトファン溶液	0.5 mmol/L
(L-トリプトファン、ロット番号 ASG2385、和光純薬工業株式会社)	

7. S9 mix

S9 mix は、S9(ロット番号 RAA-550、2006 年 9 月 29 日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor(Cofactor-I、ロット番号 999604、オリエンタル酵母工業株式会社)および日本薬局方注射用水(ロット番号 5D73、株式会社大塚製薬工場)を用いて用時調製した。

S9 は、購入後-80℃以下で保存し、製造日より 6 ヶ月以内(使用期限：製造後 6 ヶ月)に使用した。この S9 は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット(雄、7 週齢)の肝ホモジネートより調製された。

S9 mix 1 mL 中の組成は次表の通りである。

S9 mix 1 mL 中の組成	
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
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)	4 μmol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)	4 μmol
リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4	100 μmol

8. 試験群

(1) 用量設定試験

各菌株につき代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)および存在下(代謝活性化法)で試験を実施した。

直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 用量の試験群(5000、1500、500、150、50、15 および 5 $\mu\text{g}/\text{plate}$)を設定した。

(2) 本試験

各菌株につき直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

用量設定試験の結果、直接法および代謝活性化法いずれにおいても、被験物質による陽性反応は認められず、また菌株の生育阻害および被験物質の析出も認められなかったことから、本試験では、被験物質の最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、以下公比 2 で低下させた計 5 用量(5000、2500、1250、625 および 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$)を設定した。

(3) 陰性対照群および陽性対照群

用量設定試験および本試験いずれにおいても、試験系列毎に陰性対照群(日本薬局方注射用水)および次頁の表の陽性対照群を設定した。

供試菌株	陽性対照物質 (用量: $\mu\text{g}/\text{plate}$)	
	直接法	代謝活性化法
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	NaN_3 (0.5)	2-AA (2)
<i>E. coli</i> WP2uvrA	AF-2 (0.01)	2-AA (10)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (0.5)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN_3 : アジ化ナトリウム、9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物

2-AA: 2-アミノアントラセン

(4) プレート数およびプレートの識別

プレート数は、各試験群ともに3枚とした。

プレートには、識別のための試験番号および試験群を記載したラベルを貼付した。

9. 試験方法

(1) 試験菌株の前培養

容量約 40 mL の L 字管に前培養用培地(ニュートリエントブロス培地)12 mL を入れ、解凍した保存菌を 12 μL 接種し、37°C、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で 10 時間の往復振盪培養を行った。なお、菌株の接種後、L 字管は振盪培養開始まで冷却(氷冷)した。培養終了時に、得られた菌培養液の $\text{OD}_{660\text{nm}}$ を比色計(mini photo 518、タイテック株式会社)で測定し、各菌株の生菌数- $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 相関式より生菌数を算出した。生菌数が 1×10^9 cells/mL より多く、十分に菌が生育していることが確認された菌培養液を試験に使用した。

各培養液の生菌数(計算値)は次表の通りであった。

供試菌株	生菌数(計算値) ($\times 10^9$ cells/mL)	
	用量設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	3.07	3.21
<i>S. typhimurium</i> TA1535	3.87	3.87
<i>S. typhimurium</i> TA98	3.09	3.21
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2.00	2.00
<i>E. coli</i> WP2uvrA	4.50	4.85

(2) 被験物質および対照物質調製液の処理

被験物質および対照物質調製液の処理を、プレインキュベーション法で行った。

蓋付きのポリエチレン製チューブ(5 mL 容量)を使用して、被験物質あるいは対照物質調製液 0.1 mL を、直接法の場合は 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH7.4) 0.5 mL と、代謝活性化法の場合は S9 mix 0.5 mL と、それぞれ混合した。その混合液に菌培養液 0.1 mL を加え、37℃、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で 20 分間振盪培養(プレインキュベーション)した。プレインキュベーション終了後、*S. typhimurium*には 0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび 0.05 mmol/L D-ビオチンを含む重層用培地 2 mL を、*E. coli*には 0.05 mmol/L L-トリプトファンを含む重層用培地 2 mL を、それぞれ加えて混和し、最少グルコース寒天培地(プレート)に重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、プレートを 37℃に設定したインキュベータ(MIR-262：三洋電機株式会社)内で 48～49 時間静置培養した。

用量設定試験および本試験それぞれにおいて、試験に使用した被験物質調製液の最高濃度および S9 mix 調製液について無菌試験を行い、雑菌の混入の有無を確認した。

(3) 観察

各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群について、プレートでの生育阻害の有無を実体顕微鏡(SZ6045TR、オリンパス光学工業株式会社)で確認するとともに、被験物質処理群について、プレートでの被験物質の析出の有無を目視確認した。次に、各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、コロニーアナライザー(CA-11D、システムサイエンス株式会社)を用いて復帰変異コロニー数の計測を行った。

菌株の生育阻害の有無の判定は標準操作手順書に基づき以下の基準(0～4)で行い、基準 1 以上を生育阻害有りとした。

0：生育阻害が認められない。

微細なバックグラウンドコロニー(50 倍程度の倍率で観察可能)が培地一面に観察され、陰性対照群のバックグラウンドコロニーとの差が認められない場合。

1：わずかな生育阻害が認められる。

陰性対照群に比べ、バックグラウンドコロニーが減少して個々のコロニーの大きさが大きくなっている場合。

2：中程度の生育阻害が認められる。

隆起した大きな復帰変異コロニーと、平坦で小さなバックグラウンドコロニーが並存している場合。

3：強い生育阻害が認められる。

バックグラウンドコロニーが復帰変異コロニーと同程度の大きさまで成長し、両者の判別が困難である場合。

4：生存菌が全く認められない。

(4) 観察結果の集計方法

各試験群の復帰変異コロニー数の平均値±標準偏差を求めた。

10. 試験結果の評価

(1) 試験系の感度確認

各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が、それぞれ試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であり、かつ、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の2倍以上である場合に、試験系が適切な感度を有しているものと判断した。

(2) 試験結果の判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の2倍以上となり、かつ用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が、再現性を持って認められた場合に陽性であるとした。試験結果の判定にあたって、統計学的手法は用いなかった。

成 績

用量設定試験の復帰変異コロニー数の計測結果を Table 1 および 2 に、本試験の復帰変異コロニー数の計測結果を Table 3 および 4 に示す。また、用量設定試験および本試験における被験物質用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を Figure 1-1~5-2 に示す。

用量設定試験(5~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$)の結果、各菌株の被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出ならびに生育阻害は、各試験系列のいずれの菌株にも観察されなかった。

本試験(313~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$)の結果、各菌株の被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出ならびに生育阻害は、各試験系列のいずれの菌株にも観察されなかった。

用量設定試験および本試験いずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値(Appendix 3)の範囲内であり、また、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て陰性対照群の値の 2 倍以上であった。

用量設定試験および本試験いずれの無菌試験においても、被験物質調製液の最高濃度および S9 mix に雑菌の混入はみられなかった。

考 察

アジピン酸ジヒドラジドの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。

用量設定試験は、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 用量の試験群で実施した。本試験は、用量設定試験の結果に基づき、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で用量を低下させた計 5 用量の試験群で実施した。

試験の結果、用量設定試験および本試験ともに、各菌株の直接法および代謝活性化法のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、当該被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陰性であった。また、用量設定試験および本試験いずれにおいても、被験物質の析出ならびに生育障害は観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値には、それぞれの陰性対照群の値と比較して 2 倍以上の明確な増加が認められた。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、アジピン酸ジヒドラジドは、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

Table 1 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (dose-finding test) (SR05393)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9 (-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		128 , 140	11 , 15	17 , 25	11 , 20	17 , 13
		123	11	23	27	16
		(130 $\pm$ 9)	(12 $\pm$ 2)	(22 $\pm$ 4)	(19 $\pm$ 8)	(15 $\pm$ 2)
Adipic dihydrazide	5	128 , 142	11 , 11	17 , 26	15 , 21	19 , 23
		133	18	30	27	15
		(134 $\pm$ 7)	(13 $\pm$ 4)	(24 $\pm$ 7)	(21 $\pm$ 6)	(19 $\pm$ 4)
	15	132 , 118	12 , 17	31 , 21	13 , 16	23 , 17
		121	18	16	17	15
		(124 $\pm$ 7)	(16 $\pm$ 3)	(23 $\pm$ 8)	(15 $\pm$ 2)	(18 $\pm$ 4)
	50	145 , 130	18 , 12	22 , 17	21 , 20	17 , 11
		122	12	21	22	19
		(132 $\pm$ 12)	(14 $\pm$ 3)	(20 $\pm$ 3)	(21 $\pm$ 1)	(16 $\pm$ 4)
	150	105 , 115	16 , 17	26 , 18	19 , 21	18 , 22
		113	14	17	14	14
		(111 $\pm$ 5)	(16 $\pm$ 2)	(20 $\pm$ 5)	(18 $\pm$ 4)	(18 $\pm$ 4)
	500	132 , 117	24 , 26	15 , 22	13 , 16	26 , 19
		122	18	25	22	16
		(124 $\pm$ 8)	(23 $\pm$ 4)	(21 $\pm$ 5)	(17 $\pm$ 5)	(20 $\pm$ 5)
	1500	116 , 93	20 , 18	18 , 32	15 , 14	23 , 12
		108	19	22	16	8
		(106 $\pm$ 12)	(19 $\pm$ 1)	(24 $\pm$ 7)	(15 $\pm$ 1)	(14 $\pm$ 8)
	5000	110 , 95	25 , 18	9 , 12	16 , 12	13 , 17
		106	19	21	21	16
		(104 $\pm$ 8)	(21 $\pm$ 4)	(14 $\pm$ 6)	(16 $\pm$ 5)	(15 $\pm$ 2)
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	935 , 920	354 , 314	88 , 94	322 , 315	198 , 176
		956	330	101	304	132
	(Mean $\pm$ S.D.)	(937 $\pm$ 18)	(333 $\pm$ 20)	(94 $\pm$ 7)	(314 $\pm$ 9)	(169 $\pm$ 34)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

Table 2 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (dose-finding test) (SR05393)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9 (+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		149 , 144 148 (147 $\pm$ 3)	10 , 13 11 (11 $\pm$ 2)	23 , 21 28 (24 $\pm$ 4)	21 , 31 31 (28 $\pm$ 6)	14 , 17 19 (17 $\pm$ 3)
Adipic dihydrazide	5	138 , 170 149 (152 $\pm$ 16)	13 , 16 16 (15 $\pm$ 2)	32 , 32 32 (32 $\pm$ 0)	41 , 36 36 (38 $\pm$ 3)	14 , 11 15 (13 $\pm$ 2)
	15	172 , 139 171 (161 $\pm$ 19)	13 , 26 22 (20 $\pm$ 7)	12 , 17 34 (21 $\pm$ 12)	34 , 26 31 (30 $\pm$ 4)	17 , 14 22 (18 $\pm$ 4)
	50	147 , 152 142 (147 $\pm$ 5)	16 , 17 7 (13 $\pm$ 6)	26 , 28 34 (29 $\pm$ 4)	38 , 27 27 (31 $\pm$ 6)	16 , 16 19 (17 $\pm$ 2)
	150	124 , 169 148 (147 $\pm$ 23)	13 , 12 12 (12 $\pm$ 1)	22 , 24 20 (22 $\pm$ 2)	32 , 30 36 (33 $\pm$ 3)	16 , 14 19 (16 $\pm$ 3)
	500	130 , 160 165 (152 $\pm$ 19)	20 , 22 19 (20 $\pm$ 2)	31 , 30 25 (29 $\pm$ 3)	29 , 22 31 (27 $\pm$ 5)	16 , 18 17 (17 $\pm$ 1)
	1500	148 , 167 159 (158 $\pm$ 10)	13 , 18 13 (15 $\pm$ 3)	29 , 27 17 (24 $\pm$ 6)	31 , 29 26 (29 $\pm$ 3)	14 , 10 22 (15 $\pm$ 6)
	5000	147 , 142 133 (141 $\pm$ 7)	14 , 22 20 (19 $\pm$ 4)	22 , 13 16 (17 $\pm$ 5)	17 , 18 28 (21 $\pm$ 6)	13 , 17 16 (15 $\pm$ 2)
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate	1341 , 1467 1332	296 , 334 309	907 , 891 940	280 , 303 268	206 , 215 180
	(Mean $\pm$ S.D.)	(1380 $\pm$ 75)	(313 $\pm$ 19)	(913 $\pm$ 25)	(284 $\pm$ 18)	(200 $\pm$ 18)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

Table 3 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (main test) (SR05393)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9 (-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		123 , 126 118 (122 $\pm$ 4)	7 , 14 10 (10 $\pm$ 4)	22 , 16 22 (20 $\pm$ 3)	21 , 21 13 (18 $\pm$ 5)	7 , 12 7 (9 $\pm$ 3)
Adipic dihydrazide	313	131 , 128 130 (130 $\pm$ 2)	6 , 7 8 (7 $\pm$ 1)	26 , 21 18 (22 $\pm$ 4)	12 , 15 12 (13 $\pm$ 2)	8 , 6 11 (8 $\pm$ 3)
	625	111 , 130 114 (118 $\pm$ 10)	8 , 10 11 (10 $\pm$ 2)	29 , 24 20 (24 $\pm$ 5)	19 , 15 16 (17 $\pm$ 2)	6 , 6 8 (7 $\pm$ 1)
	1250	148 , 121 136 (135 $\pm$ 14)	16 , 7 15 (13 $\pm$ 5)	22 , 17 17 (19 $\pm$ 3)	22 , 16 11 (16 $\pm$ 6)	11 , 13 9 (11 $\pm$ 2)
	2500	126 , 130 108 (121 $\pm$ 12)	12 , 14 13 (13 $\pm$ 1)	13 , 21 18 (17 $\pm$ 4)	20 , 20 12 (17 $\pm$ 5)	8 , 8 7 (8 $\pm$ 1)
	5000	101 , 104 88 (98 $\pm$ 9)	14 , 5 16 (12 $\pm$ 6)	12 , 13 14 (13 $\pm$ 1)	16 , 15 22 (18 $\pm$ 4)	10 , 6 10 (9 $\pm$ 2)
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	678 , 755 771	301 , 295 287	91 , 106 102	328 , 379 362	228 , 215 337
	(Mean $\pm$ S.D.)	(735 $\pm$ 50)	(294 $\pm$ 7)	(100 $\pm$ 8)	(356 $\pm$ 26)	(260 $\pm$ 67)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)
 AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 NaN₃ : Sodium azide
 9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate
 Rev. : Revertants

Table 4 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (main test) (SR05393)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9 (+)				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvr</i> A	TA98	TA1537
Control ^a		131 , 141 125 (132 $\pm$ 8)	6 , 8 12 (9 $\pm$ 3)	29 , 25 25 (26 $\pm$ 2)	32 , 32 35 (33 $\pm$ 2)	11 , 9 12 (11 $\pm$ 2)
Adipic dihydrazide	313	130 , 133 134 (132 $\pm$ 2)	8 , 15 6 (10 $\pm$ 5)	27 , 30 18 (25 $\pm$ 6)	28 , 33 21 (27 $\pm$ 6)	8 , 10 8 (9 $\pm$ 1)
	625	127 , 129 126 (127 $\pm$ 2)	9 , 5 7 (7 $\pm$ 2)	19 , 26 21 (22 $\pm$ 4)	33 , 34 26 (31 $\pm$ 4)	15 , 11 5 (10 $\pm$ 5)
	1250	110 , 146 121 (126 $\pm$ 18)	8 , 13 16 (12 $\pm$ 4)	21 , 29 30 (27 $\pm$ 5)	32 , 31 27 (30 $\pm$ 3)	6 , 10 15 (10 $\pm$ 5)
	2500	130 , 130 120 (127 $\pm$ 6)	12 , 11 5 (9 $\pm$ 4)	22 , 29 19 (23 $\pm$ 5)	26 , 27 32 (28 $\pm$ 3)	11 , 7 7 (8 $\pm$ 2)
	5000	116 , 133 131 (127 $\pm$ 9)	8 , 10 7 (8 $\pm$ 2)	15 , 22 18 (18 $\pm$ 4)	28 , 21 26 (25 $\pm$ 4)	7 , 10 9 (9 $\pm$ 2)
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate	1376 , 1383 1293	321 , 232 313	921 , 848 887	385 , 338 321	162 , 172 212
	(Mean $\pm$ S.D.)	(1351 $\pm$ 50)	(289 $\pm$ 49)	(885 $\pm$ 37)	(348 $\pm$ 33)	(182 $\pm$ 26)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

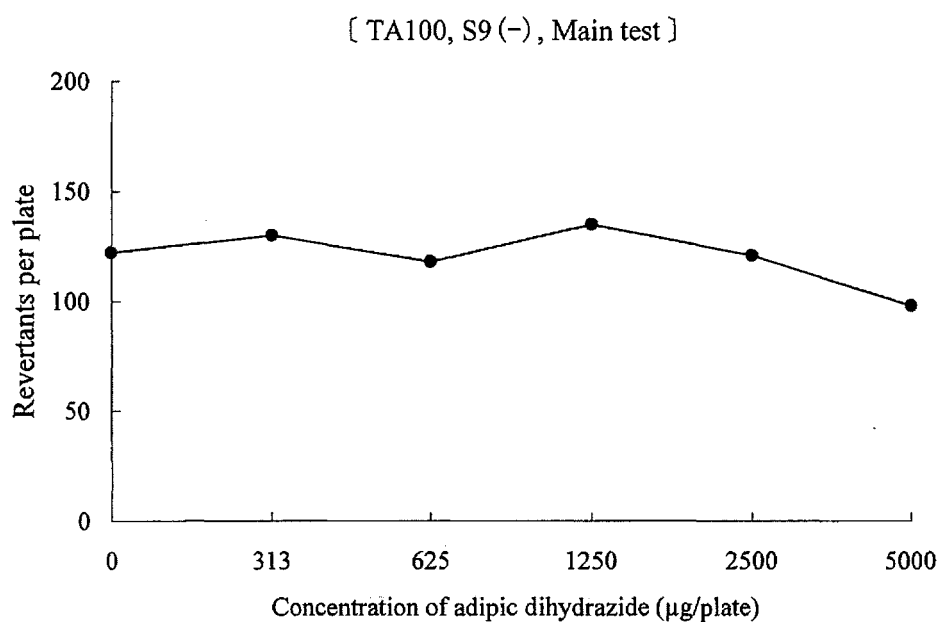
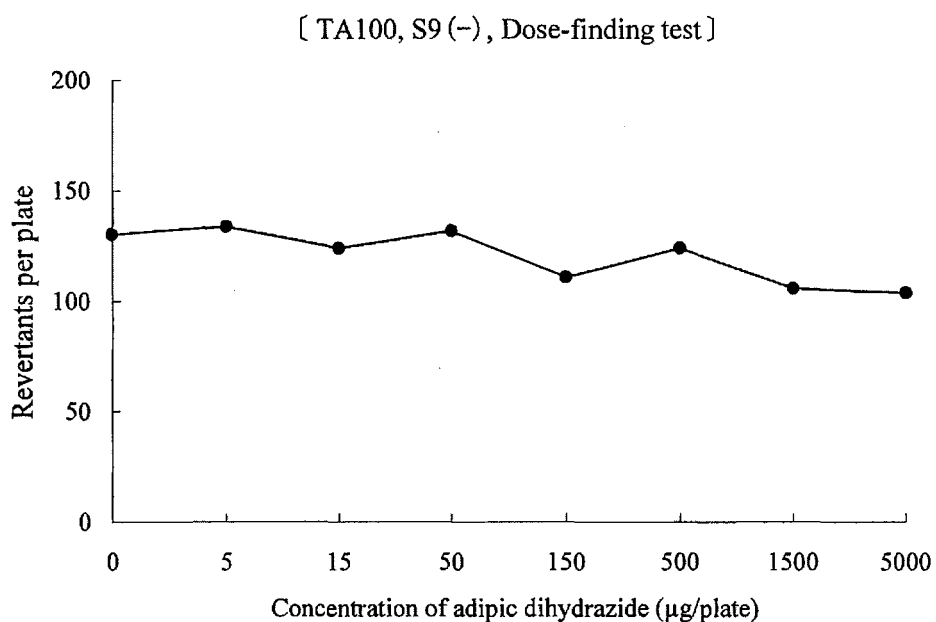


Figure 1-1 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05393)

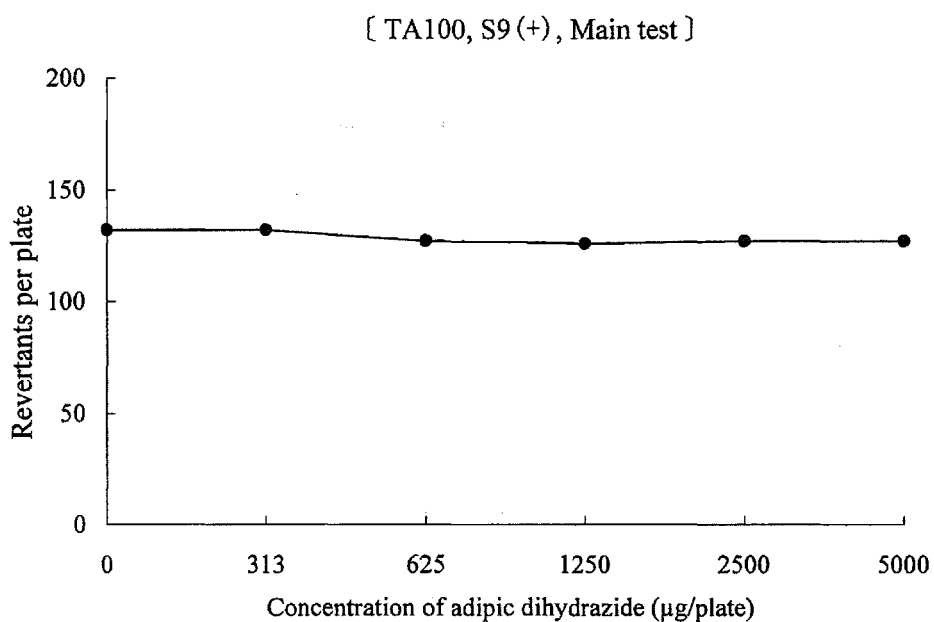
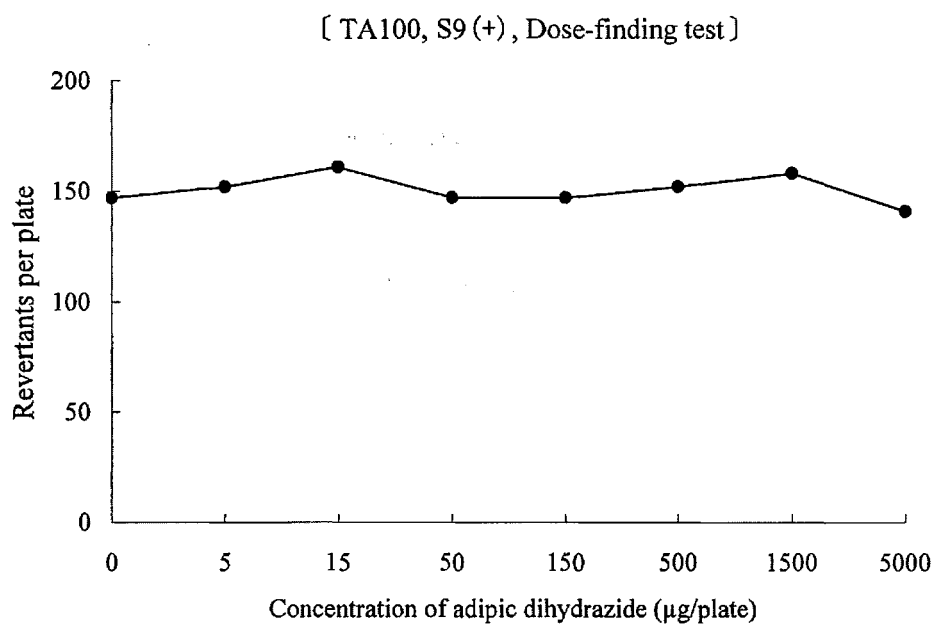


Figure 1-2 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05393)

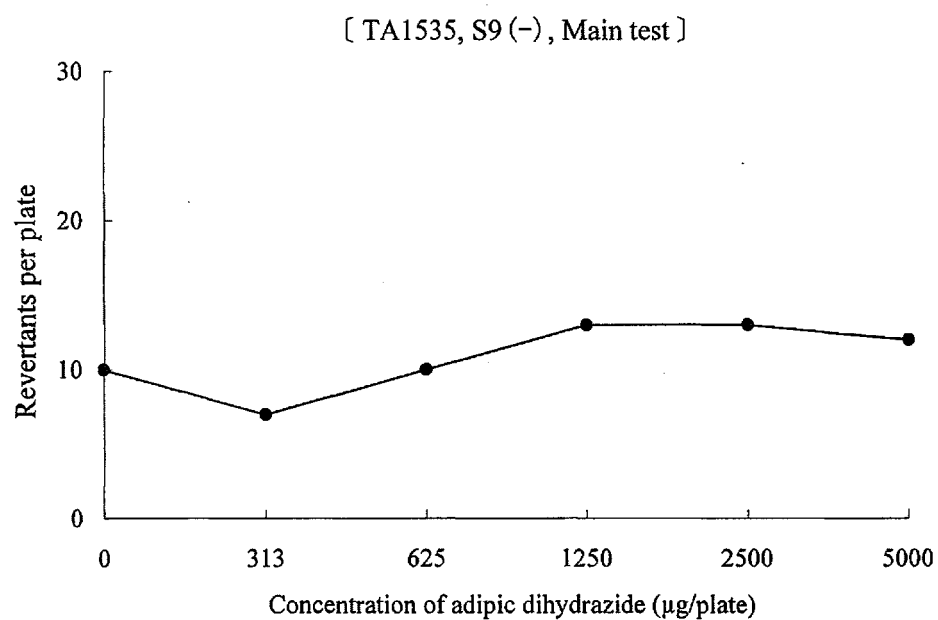
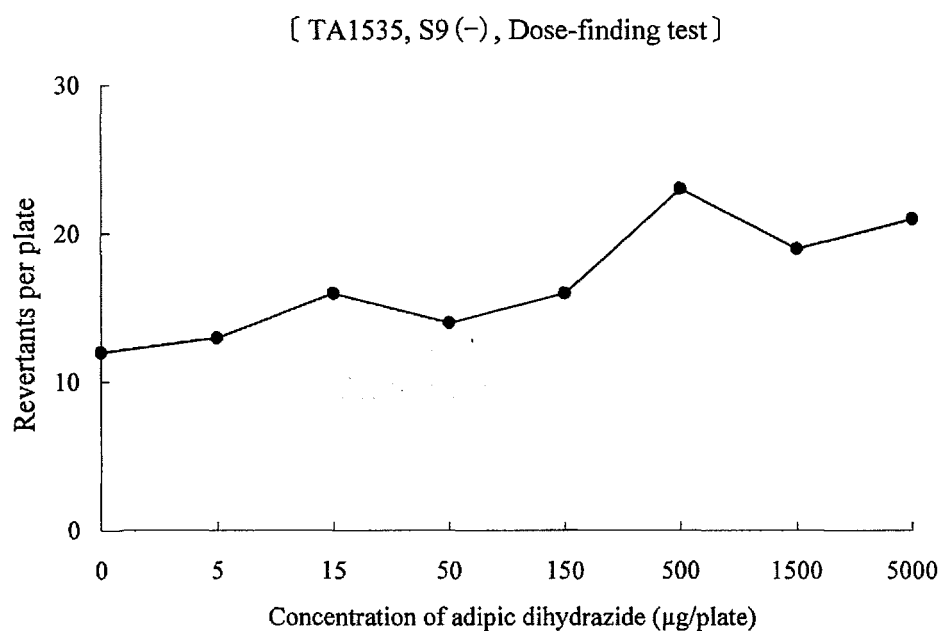


Figure 2-1 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05393)

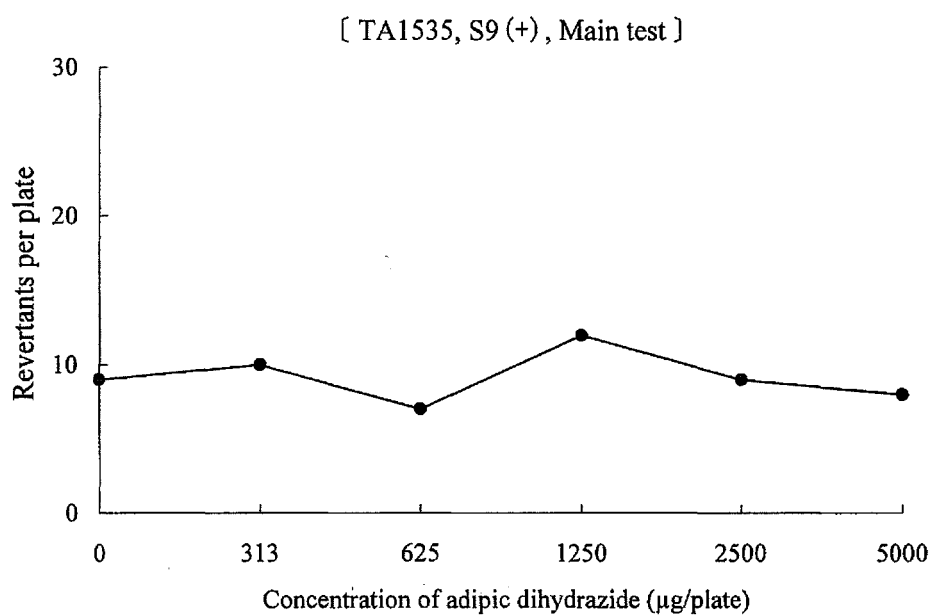
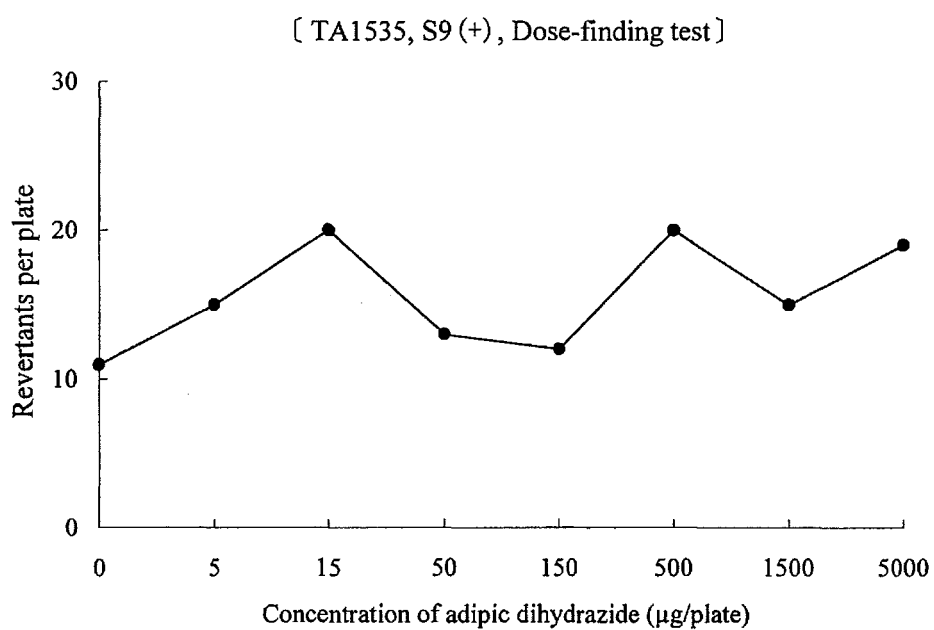


Figure 2-2 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05393)

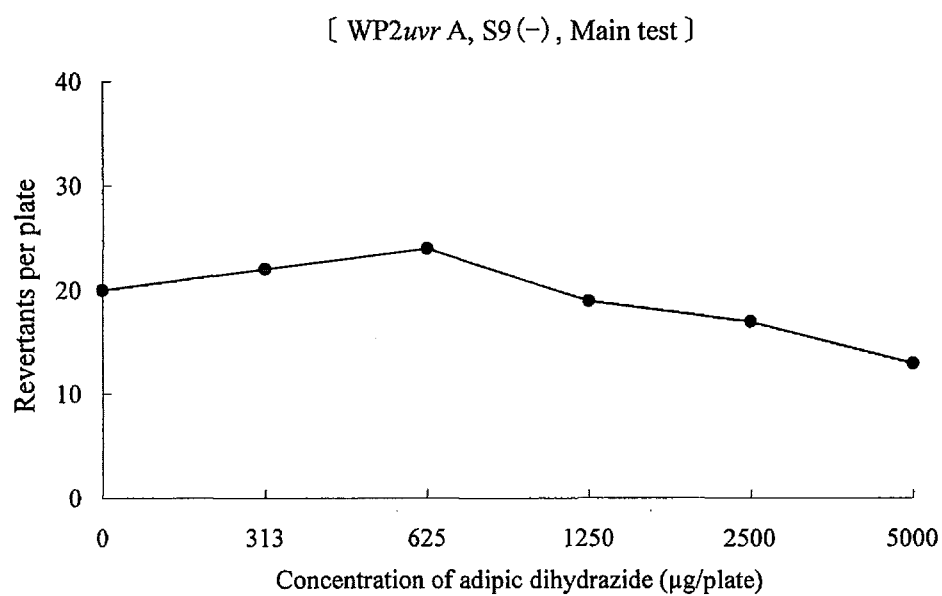
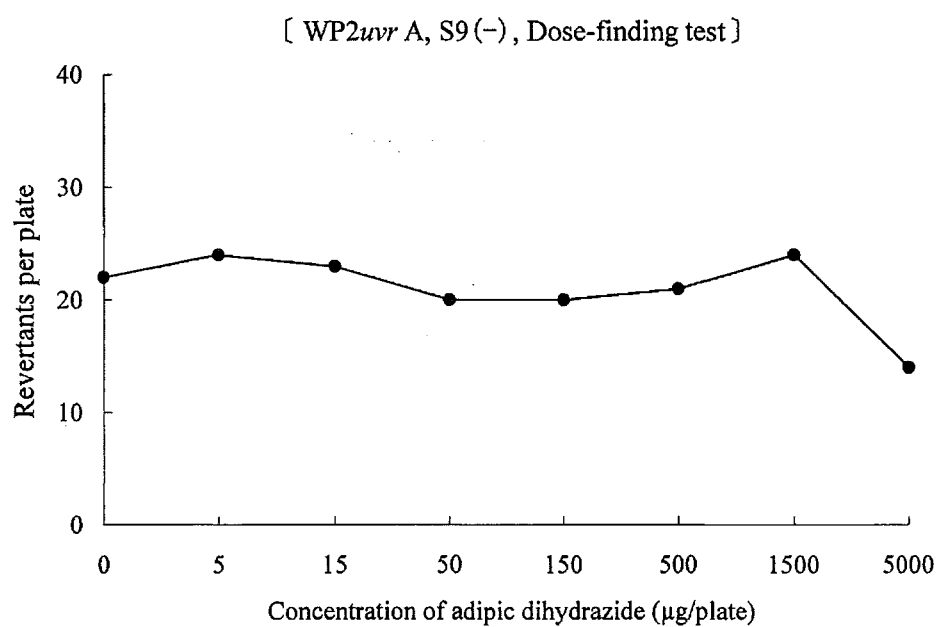


Figure 3-1 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Escherichia coli* WP2*uvr* A without metabolic activation (dose-response curves) (SR05393)

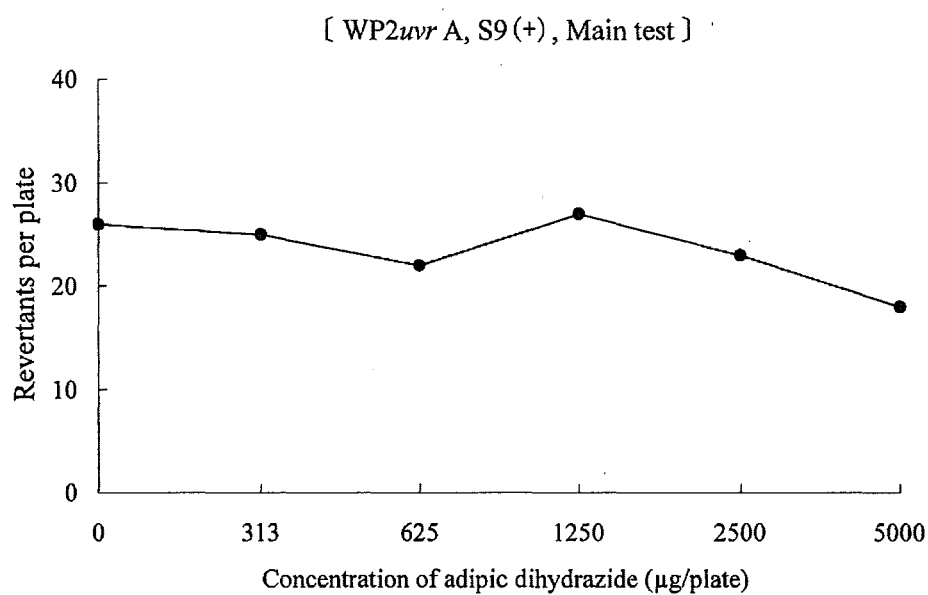
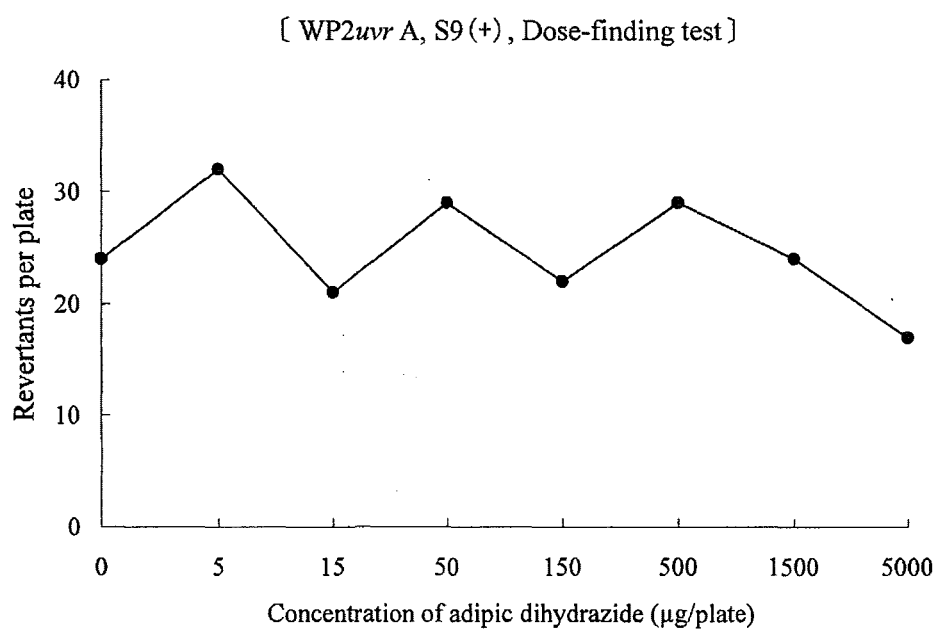


Figure 3-2 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (dose-response curves) (SR05393)

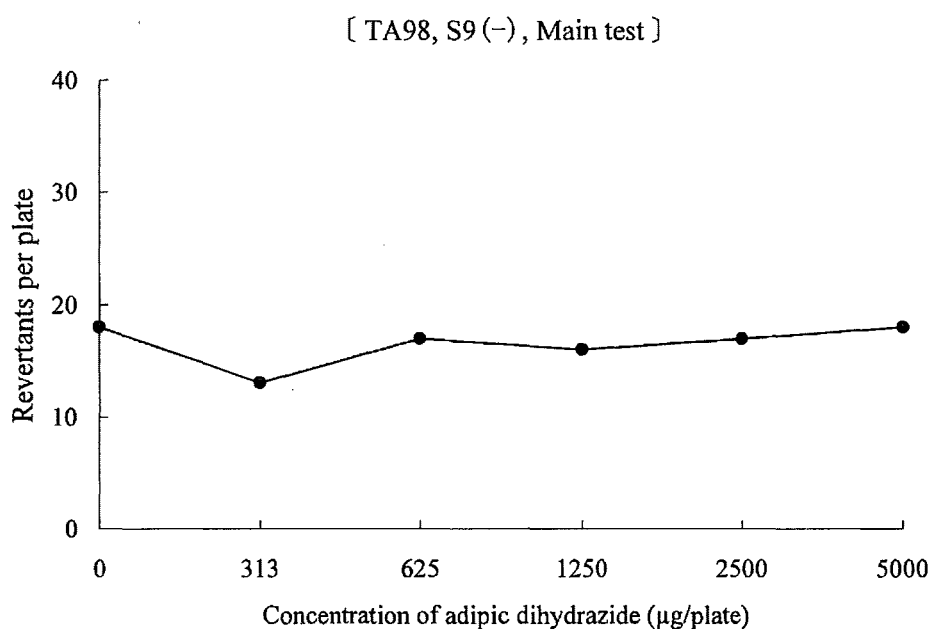
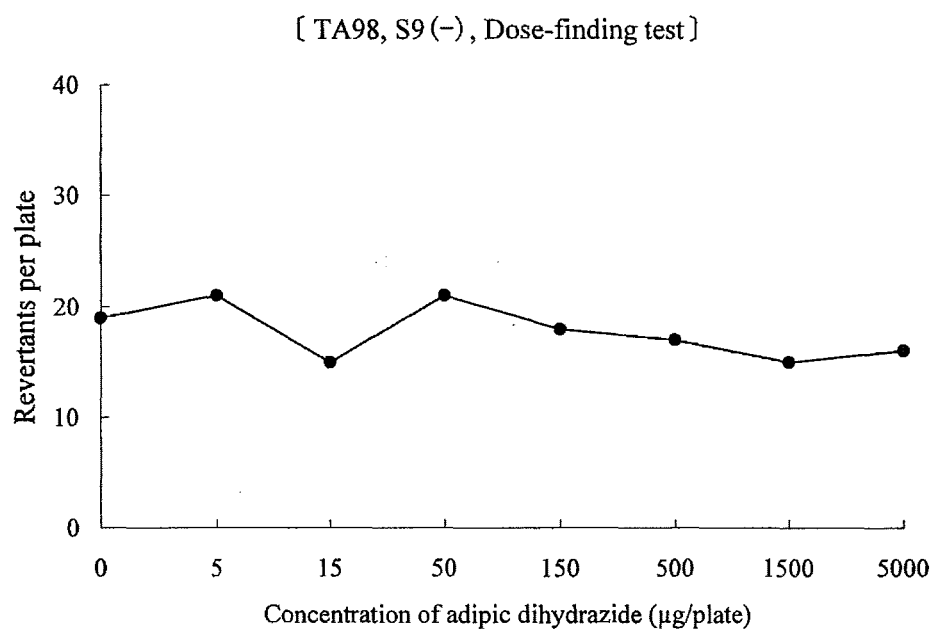


Figure 4-1 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05393)

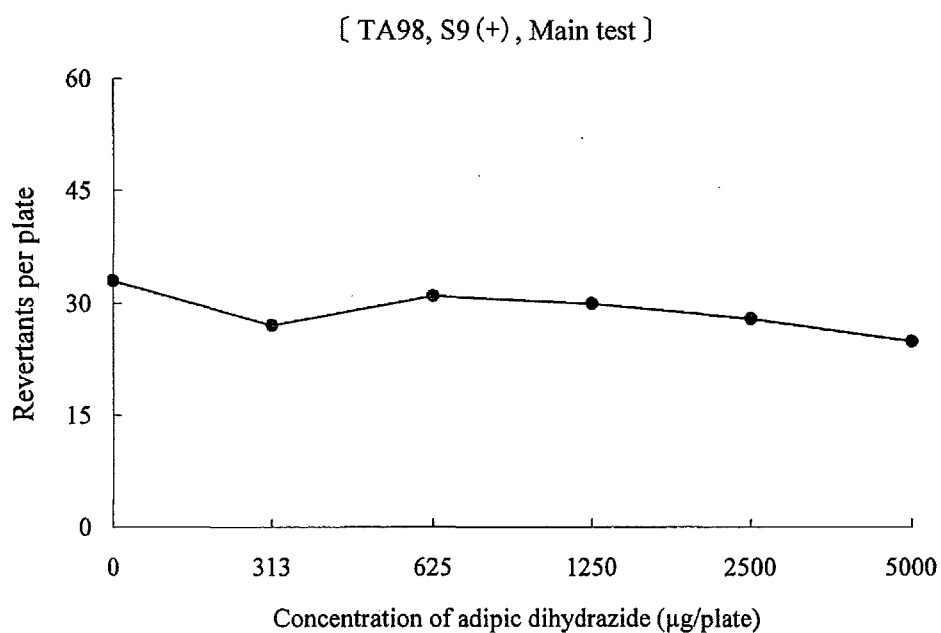
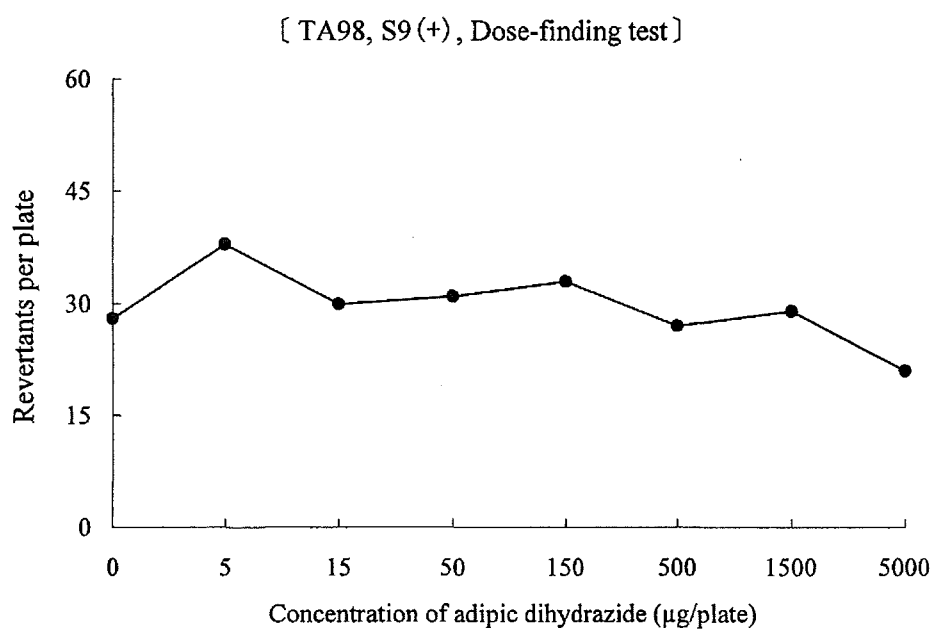
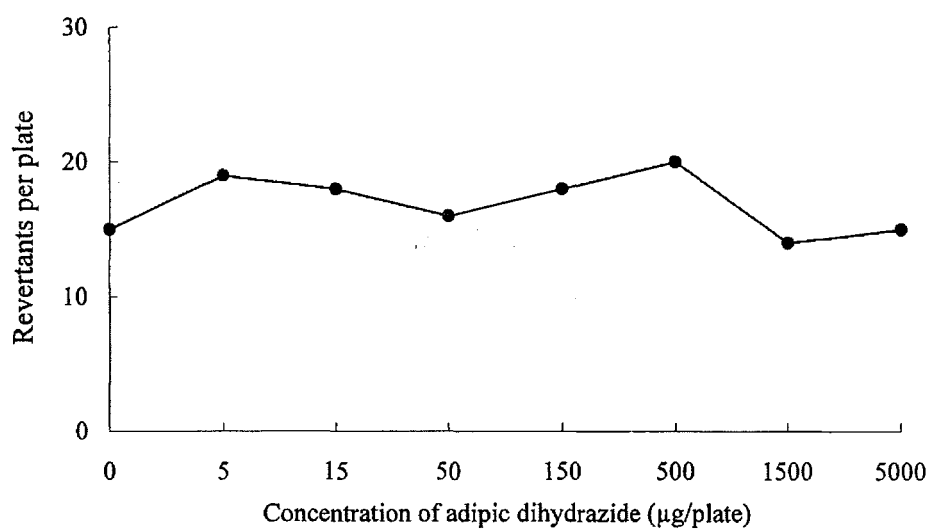


Figure 4-2 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05393)

[TA1537, S9 (-), Dose-finding test]



[TA1537, S9 (-), Main test]

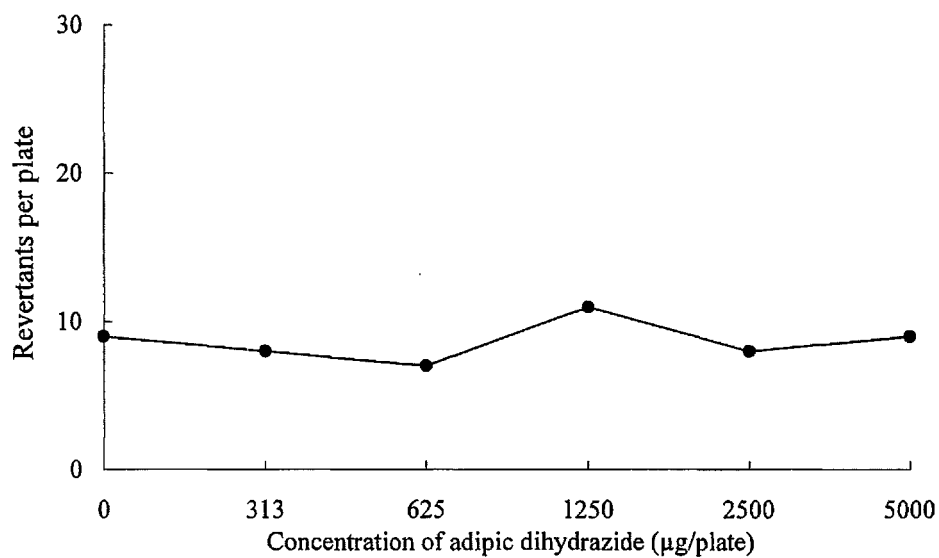


Figure 5-1 Reverse mutation test of adipoic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05393)

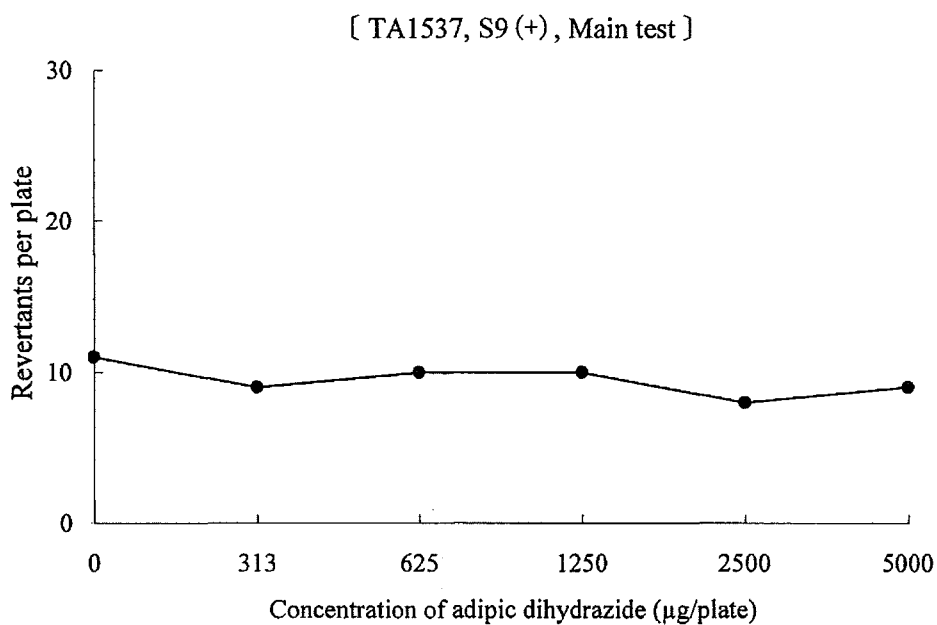
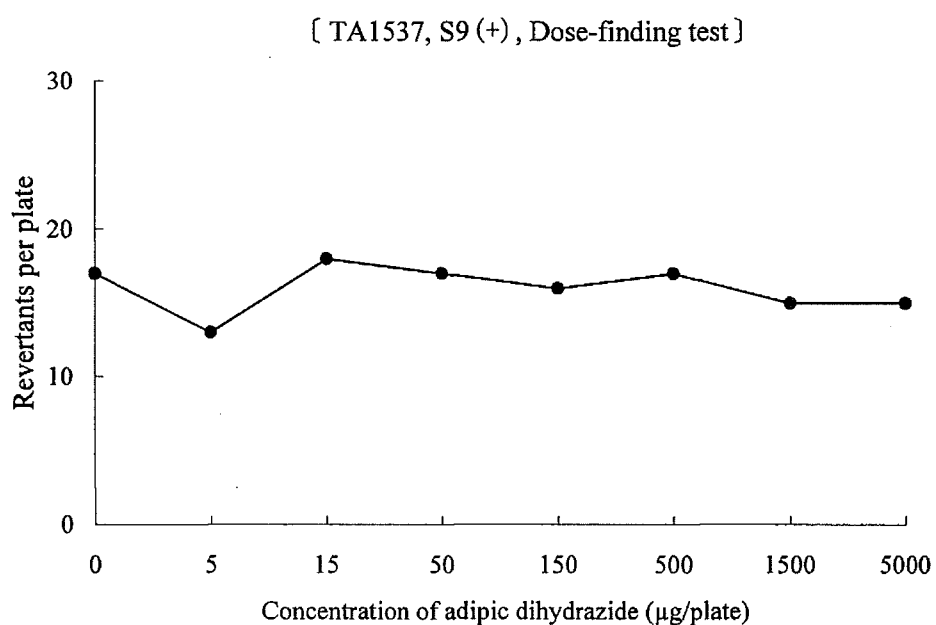


Figure 5-2 Reverse mutation test of adipic dihydrazide in *Salmonella typhimurium* TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05393)