

最終報告書

表 題：tert-ペンチルベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR05344

株式会社 化合物安全性研究所

目次

表紙	1
目次	4
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	18
考察	19

Tables

Table 1	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-finding test)	21
Table 2	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-finding test)	22
Table 3	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (I)	23
Table 4	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (I)	24

Table 5	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (II)	25
Table 6	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (II)	26

Figures

Figure 1-1	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 without metabolic activation (dose-response curves)	27
Figure 1-2	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 with metabolic activation (dose-response curves)	28
Figure 2-1	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 without metabolic activation (dose-response curves)	29
Figure 2-2	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 with metabolic activation (dose-response curves)	30
Figure 3-1	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-response curves)	31
Figure 3-2	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-response curves)	32
Figure 4-1	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 without metabolic activation (dose-response curves)	33
Figure 4-2	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 with metabolic activation (dose-response curves)	34
Figure 5-1	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 without metabolic activation (dose-response curves)	35
Figure 5-2	Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 with metabolic activation (dose-response curves)	36

要 約

tert-ペンチルベンゼン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により実施した。

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 で低下させた計 7 用量の試験群 (5~5000 µg/plate) を設定した。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 125 あるいは 250 あるいは 1000 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 6 用量 (3.91~125 µg/plate) あるいは 7 用量 (3.91~250 あるいは 15.6~1000 µg/plate) の試験群を設定した。

本試験を 2 回実施した結果、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、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値の 2 倍未満であり、また用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられず、当該被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陰性であった。被験物質の析出が *S. typhimurium* TA100 および TA98 の代謝活性化法の 250 µg/plate の用量ならびに *E. coli* WP2uvrA の代謝活性化法の 250 µg/plate 以上の用量で観察された。生育阻害が、各菌株の 62.5、125 あるいは 500 µg/plate 以上の用量で観察された。

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受性を有していたことが確認された。

以上のことから、tert-ペンチルベンゼンは、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。

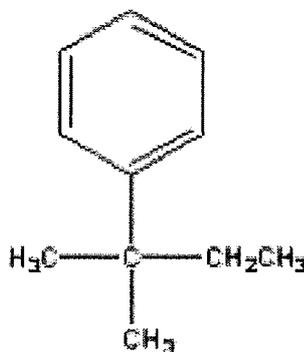
緒 言

tert-ペンチルベンゼン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により実施した。

材料および方法

1. 被験物質

名称	: tert-ペンチルベンゼン
英名	: tert-pentylbenzene
別名	: tert-アミルベンゼン ; tert-amylbenzene
CAS No.	: 2049-95-8
化学物質番号	: 化審法 3-22
構造式	:



化学式	: $C_6H_5C(CH_3)_2CH_2CH_3$
分子量	: 148.24
物理化学的性質	: 外観 ; 無色澄明の液体 臭い ; 特異臭 沸点 ; 189~191°C

引火点 ; 60°C

発火点 ; データなし

蒸気圧 ; データなし

比重(密度) ; 0.875 g/mL (20°C)

溶解性 ; 水に不溶。エタノール、エーテルに易溶

純度(含量) : 99.5% (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 : 300 g(関連試験と共通)

安定性 : 実験終了後に、残余被験物質について製造者が実施した純度に関する分析成績を入手し(Appendix 2)、実験期間中の安定性を確認した。

保存条件 : 密閉、冷暗所(実測範囲 : 2~7°C)

取扱上の注意 : ゴム手袋およびマスク等を着用し、皮膚との接触も避け取扱った。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、一部を純度分析のため製造者へ送付した。残余の被験物質は焼却処分するために、産業廃棄物として回収する。

2. 被験物質の調製

被験物質を精秤し、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)を用いて溶解および希釈し調製した。

用量設定試験では、50 mg/mL 調製液からジメチルスルホキシドを用いて公比約 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、10 mg/mL 調製液からジメチルスルホキシドを用いて公比 2 で段階希釈し、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.0781 および 0.0391 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、用量設定試験および本試験の 1 回目では調製後 2.3 時間以内に、本試験の 2 回目では調製後 2.5 時間以内に試験に使用した。

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、被験物質の媒体の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)を使用した。陰性対照物質は、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い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 2 カ月以内(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水和物 (含量 98.8%) ロット番号 03024JR Sigma-Aldrich Corporation	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、これらの特性および感受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、株式会社大塚製薬工場)を用いて 25 g/L に調製した。*Salmonella 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

次頁の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 (ロット番号 5123150、Becton, Dickinson and Company)	0.6 %
塩化ナトリウム (ロット番号 611F1714、関東化学株式会社)	0.5 %
(B) アミノ酸溶液	
L-ヒスチジンおよびD-ビオチン溶液 (L-ヒスチジン、ロット番号 DWN1024*、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	各々 0.5 mmol/L
L-トリプトファン溶液 (L-トリプトファン、ロット番号 ASG2385、和光純薬工業株式会社)	0.5 mmol/L

* 用量設定試験で使用 ** 本試験で使用

7. S9 mix

S9 mix は、S9(ロット番号 RAA-546、2006年7月7日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor(Cofactor-I、ロット番号 999601、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 5L88、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ヵ月以内(使用期限:製造後6ヵ月)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 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(5000、1500、500、150、50、15 および 5 µg/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ともに、50、150 あるいは 500 µg/plate 以上の用量で生育阻害が観察されたことから、本試験では、被験物質の最高用量をそれぞれ 125 あるいは 250 あるいは 1000 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 6 用量(3.91~125 µg/plate)あるいは 7 用量(3.91~250 あるいは 15.6~1000 µg/plate)の試験群を設定した。

(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(ジメチルスルホキシド)および次表の陽性対照群を設定した。

供試菌株	陽性対照物質 (用量: µg/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

NaN₃ : アジ化ナトリウム、 9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

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、これに解凍した保存菌を 12 μ L 接種し、L 字管を氷冷後、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。培養終了時に、得られた菌培養液の OD_{660nm} 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-OD_{660nm} 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(1回目)	本試験(2回目)
<i>S. typhimurium</i> TA100	3.35	3.35	3.07
<i>S. typhimurium</i> TA1535	3.87	3.87	3.87
<i>E. coli</i> WP2uvrA	4.85	4.68	4.50
<i>S. typhimurium</i> TA98	3.21	3.21	3.21
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2.00	2.07	2.00

(2) 被験物質調製液および対照物質調製液の処理

被験物質調製液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、被験物質調製液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°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 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°C で 48~49 時間静置培養した(MIR-262: 三洋電機株式会社)。

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 調製液について雑菌の混入の有無を確認した。

(3) プレートの観察

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)あるいは被験物質の析出がコロニーアナライザーの計数に影響すると考えられるプレートについては実体顕微鏡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、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。

1：わずかな生育阻害が認められる。

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。

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。

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。

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、現性を持って認められた場合に、被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陽性であるとした。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

用量設定試験の結果を Table 1 および 2 に、本試験の結果を Table 3~6 に示す。また、本試験における被験物質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 µg/plate)の結果、各菌株について、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、用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられなかった。被験物質の析出が、直接法の 1500 µg/plate 以上の用量および代謝活性化法の 150 µg/plate 以上の用量で観察された。生育阻害が、直接法および代謝活性化法ともに各菌株の 50、150 あるいは 500 µg/plate 以上の用量で観察された。

本試験(3.91~125 µg/mL、3.91~250 µg/mL あるいは 15.6~1000 µg/plate)を 2 回実施した結果、各菌株について、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、用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられなかった。被験物質の析出が、*S. typhimurium* TA100 および TA98 の代謝活性化法の 250 µg/plate の用量ならびに *E. coli* WP2uvrA の代謝活性化法の 250 µg/plate 以上の用量で観察された。生育阻害が、直接法および代謝活性化法ともに各菌株の 62.5、125 あるいは 500 µg/plate 以上の用量で観察された。

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

tert-ペンチルベンゼンの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*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 125 あるいは 250 あるいは 1000 µg/plate とし、以下公比 2 で用量を低下させた計 6 あるいは 7 用量の試験群で 2 回実施した。

本試験の結果、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、結果は陰性であった。被験物質の析出が、代謝活性化法において 250 µg/plate あるいは 250 µg/plate 以上の用量で観察された。生育阻害が、各菌株の高用量で観察された。これらの結果は、2 回の本試験において再現性が確認された。

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受性を有していたことが確認された。

以上のことから、tert-ペンチルベンゼンは、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 tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (dose-finding test)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean \pm S.D.)				
		S9(-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		104 , 122 85 (104 \pm 19)	12 , 6 12 (10 \pm 3)	25 , 23 17 (22 \pm 4)	22 , 10 19 (17 \pm 6)	19 , 18 16 (18 \pm 2)
tert-Pentylbenzene	5	95 , 87 72 (85 \pm 12)	11 , 7 12 (10 \pm 3)	28 , 26 18 (24 \pm 5)	17 , 18 26 (20 \pm 5)	11 , 20 10 (14 \pm 6)
	15	85 , 88 80 (84 \pm 4)	9 , 7 8 (8 \pm 1)	16 , 27 21 (21 \pm 6)	21 , 18 22 (20 \pm 2)	12 , 17 15 (15 \pm 3)
	50	46 , 71 51 (56 \pm 13)	6 [*] , 10 [*] 7 [*] (8 \pm 2)	16 [*] , 12 [*] 14 [*] (14 \pm 2)	12 , 11 11 (11 \pm 1)	7 [*] , 8 [*] 8 [*] (8 \pm 1)
	150	51 [*] , 55 [*] 55 [*] (54 \pm 2)	8 [*] , 7 [*] 9 [*] (8 \pm 1)	7 [*] , 13 [*] 7 [*] (9 \pm 3)	11 [*] , 14 [*] 12 [*] (12 \pm 2)	6 [*] , 4 [*] 3 [*] (4 \pm 2)
	500	57 [*] , 42 [*] 48 [*] (49 \pm 8)	4 [*] , 3 [*] 1 [*] (3 \pm 2)	12 [*] , 12 [*] 13 [*] (12 \pm 1)	10 [*] , 9 [*] 14 [*] (11 \pm 3)	1 [*] , 1 [*] 3 [*] (2 \pm 1)
	1500	49 ^{**} , 52 ^{**} 55 ^{**} (52 \pm 3)	2 ^{**} , 1 ^{**} 0 ^{**} (1 \pm 1)	12 ^{**} , 11 ^{**} 15 ^{**} (13 \pm 2)	6 ^{**} , 1 ^{**} 9 ^{**} (5 \pm 4)	0 ^{**} , 4 ^{**} 2 ^{**} (2 \pm 2)
	5000	54 ^{**} , 34 ^{**} 42 ^{**} (43 \pm 10)	1 ^{**} , 0 ^{**} 3 ^{**} (1 \pm 2)	10 ^{**} , 14 ^{**} 12 ^{**} (12 \pm 2)	8 ^{**} , 3 ^{**} 10 ^{**} (7 \pm 4)	3 ^{**} , 3 ^{**} 0 ^{**} (2 \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 (Mean \pm S.D.)	702 , 723 725 (717 \pm 13)	323 , 330 316 (323 \pm 7)	93 , 93 104 (97 \pm 6)	315 , 342 332 (330 \pm 14)	149 , 189 277 (205 \pm 65)

a : Dimethyl sulfoxide

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

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

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

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9(+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		124 , 135 125 (128±6)	10 , 12 10 (11±1)	32 , 15 19 (22±9)	35 , 29 31 (32±3)	20 , 19 14 (18±3)
tert-Pentylbenzene	5	137 , 124 101 (121±18)	10 , 11 10 (10±1)	38 , 25 27 (30±7)	33 , 34 35 (34±1)	25 , 16 15 (19±6)
	15	121 , 122 134 (126±7)	12 , 12 11 (12±1)	19 , 35 26 (27±8)	33 , 30 25 (29±4)	19 , 13 24 (19±6)
	50	130 , 133 127 (130±3)	6* , 8* 6* (7±1)	36 , 15 22 (24±11)	41 , 31 36 (36±5)	8* , 14* 22* (15±7)
	150	109** , 72** 96** (92±19)	14** , 9** 12** (12±3)	29# , 22# 21# (24±4)	26** , 29** 17** (24±6)	8** , 11** 16** (12±4)
	500	77** , 77** 88** (81±6)	8** , 1** 3** (4±4)	19** , 12** 17** (16±4)	31** , 20** 23** (25±6)	9** , 5** 10** (8±3)
	1500	62** , 47** 57** (55±8)	4** , 5** 2** (4±2)	19** , 16** 15** (17±2)	17** , 25** 22** (21±4)	0** , 8** 2** (3±4)
5000	57** , 31** 25** (38±17)	3** , 2** 0** (2±2)	8** , 13** 11** (11±3)	13** , 19** 9** (14±5)	0** , 0** 0** (0±0)	
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate (Mean±S.D.)	1323 , 1258 1291 (1291±33)	301 , 297 347 (315±28)	889 , 961 908 (919±37)	299 , 294 300 (298±3)	187 , 199 172 (186±14)

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

Table 3 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (I)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean \pm S.D.)				
		S9 (-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		126 , 136 126 (129 \pm 6)	10 , 7 12 (10 \pm 3)	23 , 14 22 (20 \pm 5)	13 , 16 20 (16 \pm 4)	10 , 10 16 (12 \pm 3)
tert-Pentylbenzene	3.91	133 , 117 126 (125 \pm 8)	10 , 16 10 (12 \pm 3)	13 , 16 17 (15 \pm 2)	13 , 18 12 (14 \pm 3)	11 , 16 13 (13 \pm 3)
	7.81	143 , 116 146 (135 \pm 17)	7 , 11 7 (8 \pm 2)	17 , 18 20 (18 \pm 2)	17 , 13 16 (15 \pm 2)	13 , 9 11 (11 \pm 2)
	15.6	147 , 113 134 (131 \pm 17)	11 , 12 6 (10 \pm 3)	17 , 15 13 (15 \pm 2)	16 , 11 18 (15 \pm 4)	8 , 13 12 (11 \pm 3)
	31.3	117 , 119 110 (115 \pm 5)	7 , 13 6 (9 \pm 4)	12 , 20 17 (16 \pm 4)	10 , 15 20 (15 \pm 5)	16 , 8 13 (12 \pm 4)
	62.5	52 , 57 60 (56 \pm 4)	10 [*] , 10 [*] 7 [*] (9 \pm 2)	18 [*] , 15 [*] 20 [*] (18 \pm 3)	14 , 8 11 (11 \pm 3)	7 [*] , 7 [*] 5 [*] (6 \pm 1)
	125	47 [*] , 63 [*] 50 [*] (53 \pm 9)	11 [*] , 9 [*] 6 [*] (9 \pm 3)	15 [*] , 20 [*] 16 [*] (17 \pm 3)	8 [*] , 9 [*] 13 [*] (10 \pm 3)	3 [*] , 5 [*] 5 [*] (4 \pm 1)
	250	47 [*] , 72 [*] 63 [*] (61 \pm 13)	-	-	14 [*] , 6 [*] 9 [*] (10 \pm 4)	-
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	716 , 718 663	289 , 277 310	90 , 97 101	344 , 382 375	199 , 223 234
	(Mean \pm S.D.)	(699 \pm 31)	(292 \pm 17)	(96 \pm 6)	(367 \pm 20)	(219 \pm 18)

a : Dimethyl sulfoxide

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

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

* : Growth inhibition

- : Blank

Table 4 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (I)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9(+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		122 , 151 120 (131±17)	13 , 8 11 (11±3)	17 , 23 26 (22±5)	22 , 25 25 (24±2)	18 , 17 11 (15±4)
tert-Pentylbenzene	3.91	136 , 135 120 (130±9)	7 , 8 8 (8±1)	-	32 , 25 30 (29±4)	13 , 12 16 (14±2)
	7.81	158 , 141 143 (147±9)	10 , 13 10 (11±2)	-	34 , 25 32 (30±5)	11 , 10 7 (9±2)
	15.6	142 , 129 149 (140±10)	11 , 4 10 (8±4)	21 , 26 24 (24±3)	27 , 30 25 (27±3)	9 , 16 15 (13±4)
	31.3	130 , 128 141 (133±7)	15 , 8 8 (10±4)	25 , 24 22 (24±2)	27 , 35 20 (27±8)	22 , 15 14 (17±4)
	62.5	117 , 117 128 (121±6)	7 [*] , 8 [*] 7 [*] (7±1)	25 , 14 16 (18±6)	21 , 18 26 (22±4)	11 [*] , 14 [*] 7 [*] (11±4)
	125	74 [*] , 90 [*] 90 [*] (85±9)	10 [*] , 8 [*] 11 [*] (10±2)	19 , 16 16 (17±2)	29 [*] , 15 [*] 30 [*] (25±8)	14 [*] , 8 [*] 17 [*] (13±5)
	250	89 ^{**} , 110 ^{**} 82 ^{**} (94±15)	-	17 [#] , 22 [#] 22 [#] (20±3)	18 ^{**} , 21 ^{**} 17 ^{**} (19±2)	-
	500	-	-	22 ^{**} , 19 ^{**} 21 ^{**} (21±2)	-	-
1000	-	-	18 ^{**} , 24 ^{**} 20 ^{**} (21±3)	-	-	
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate (Mean±S.D.)	1286 , 1234 1290 (1270±31)	243 , 300 333 (292±46)	974 , 961 1023 (986±33)	289 , 311 270 (290±21)	191 , 216 210 (206±13)

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

- : Blank

Table 5 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (II)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9 (-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		114 , 128 123 (122±7)	10 , 11 10 (10±1)	28 , 20 22 (23±4)	11 , 16 11 (13±3)	8 , 6 11 (8±3)
tert-Pentylbenzene	3.91	125 , 142 135 (134±9)	9 , 10 11 (10±1)	27 , 33 29 (30±3)	14 , 16 8 (13±4)	14 , 3 12 (10±6)
	7.81	120 , 141 147 (136±14)	9 , 7 9 (8±1)	25 , 32 18 (25±7)	18 , 21 13 (17±4)	13 , 5 4 (7±5)
	15.6	122 , 115 132 (123±9)	8 , 9 11 (9±2)	23 , 25 32 (27±5)	14 , 12 12 (13±1)	11 , 7 7 (8±2)
	31.3	109 , 119 141 (123±16)	6 , 6 3 (5±2)	17 , 20 21 (19±2)	21 , 17 12 (17±5)	11 , 7 6 (8±3)
	62.5	50 , 64 58 (57±7)	5 [*] , 1 [*] 7 [*] (4±3)	7 [*] , 15 [*] 19 [*] (14±6)	8 , 14 9 (10±3)	4 [*] , 6 [*] 1 [*] (4±3)
	125	54 [*] , 51 [*] 58 [*] (54±4)	2 [*] , 1 [*] 4 [*] (2±2)	8 [*] , 7 [*] 8 [*] (8±1)	13 [*] , 20 [*] 7 [*] (13±7)	3 [*] , 3 [*] 2 [*] (3±1)
	250	50 [*] , 33 [*] 54 [*] (46±11)	-	-	11 [*] , 7 [*] 10 [*] (9±2)	-
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate (Mean±S.D.)	903 , 941 970 (938±34)	275 , 327 325 (309±29)	113 , 127 107 (116±10)	437 , 448 450 (445±7)	209 , 147 233 (196±44)

a : Dimethyl sulfoxide

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

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

* : Growth inhibition

- : Blank

Table 6 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (II)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9(+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		132 , 143 124 (133±10)	9 , 11 13 (11±2)	22 , 24 27 (24±3)	32 , 26 24 (27±4)	10 , 11 9 (10±1)
tert-Pentylbenzene	3.91	151 , 138 152 (147±8)	12 , 13 15 (13±2)	-	21 , 26 31 (26±5)	12 , 12 12 (12±0)
	7.81	152 , 157 135 (148±12)	9 , 9 11 (10±1)	-	28 , 26 26 (27±1)	16 , 8 8 (11±5)
	15.6	140 , 151 137 (143±7)	9 , 8 11 (9±2)	32 , 31 36 (33±3)	23 , 32 26 (27±5)	8 , 4 7 (6±2)
	31.3	141 , 157 119 (139±19)	7 , 5 10 (7±3)	35 , 36 26 (32±6)	27 , 30 31 (29±2)	8 , 6 9 (8±2)
	62.5	108 , 134 103 (115±17)	7 [*] , 7 [*] 7 [*] (7±0)	33 , 25 19 (26±7)	32 , 32 26 (30±3)	7 [*] , 9 [*] 12 [*] (9±3)
	125	84 [*] , 93 [*] 80 [*] (86±7)	9 [*] , 5 [*] 6 [*] (7±2)	29 , 22 33 (28±6)	23 [*] , 26 [*] 33 [*] (27±5)	12 [*] , 10 [*] 11 [*] (11±1)
	250	90 ^{**} , 78 ^{**} 53 ^{**} (74±19)	-	10 [#] , 20 [#] 12 [#] (14±5)	19 ^{**} , 18 ^{**} 13 ^{**} (17±3)	-
	500	-	-	16 ^{**} , 17 ^{**} 17 ^{**} (17±1)	-	-
1000	-	-	14 ^{**} , 16 ^{**} 14 ^{**} (15±1)	-	-	
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate	1273 , 1135 1144	318 , 339 388	1056 , 1011 947	217 , 230 233	221 , 204 229
	(Mean±S.D.)	(1184±77)	(348±36)	(1005±55)	(227±9)	(218±13)

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

- : Blank

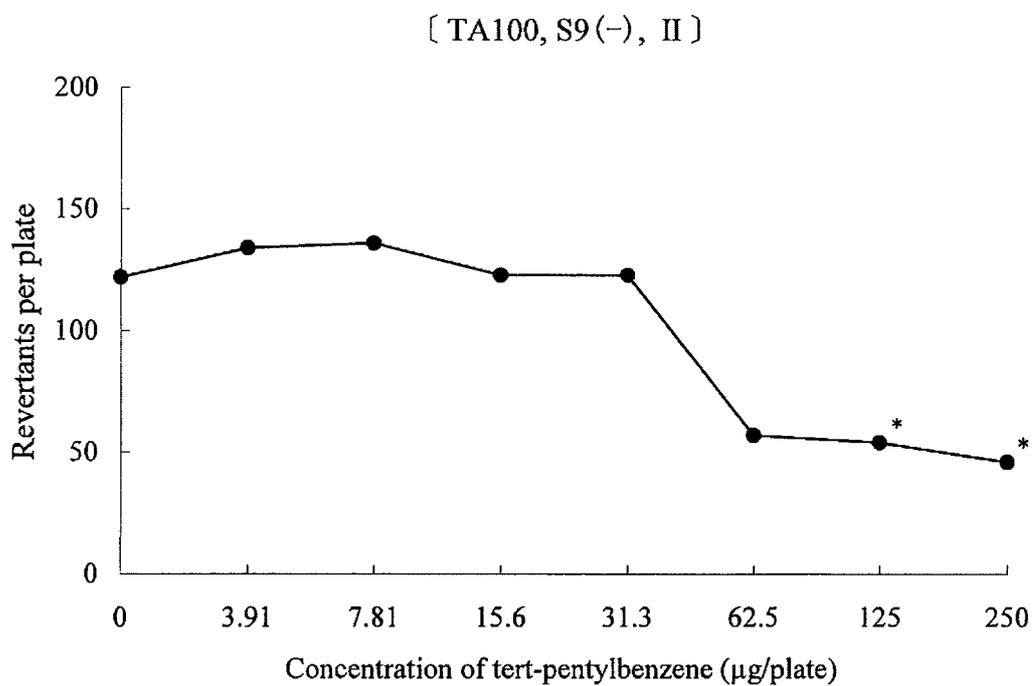
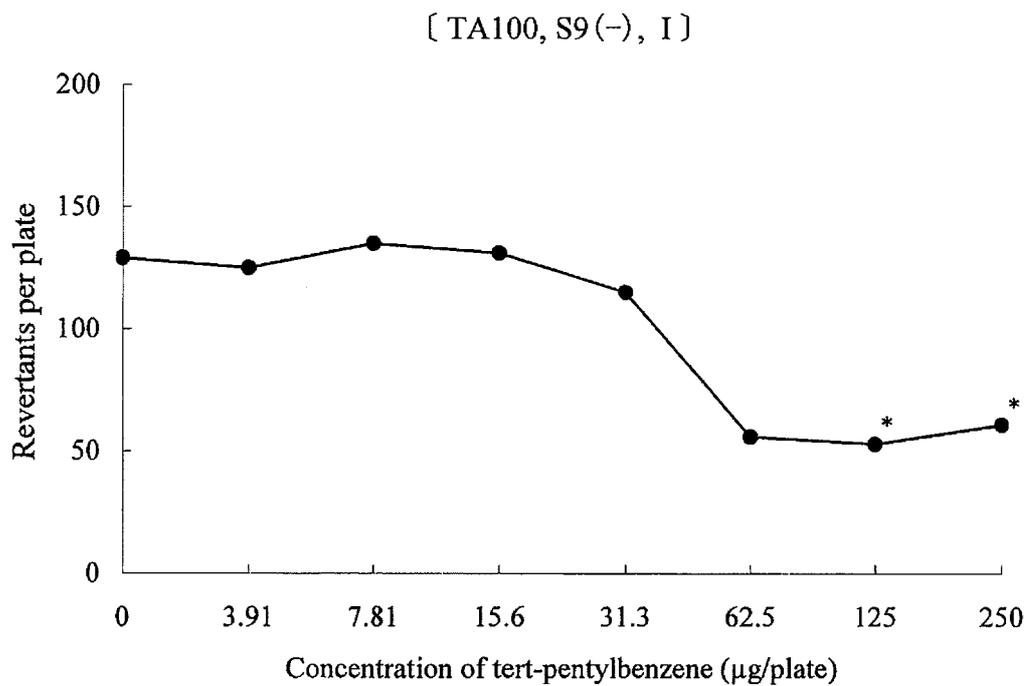


Figure 1-1 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation (dose-response curves)

* : Growth inhibition

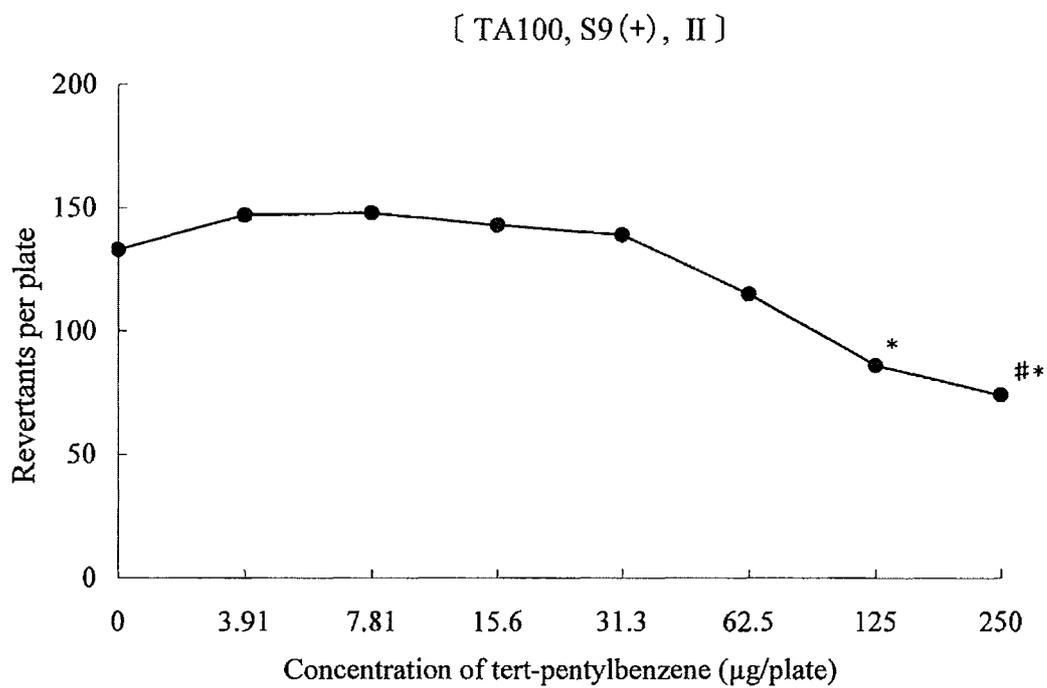
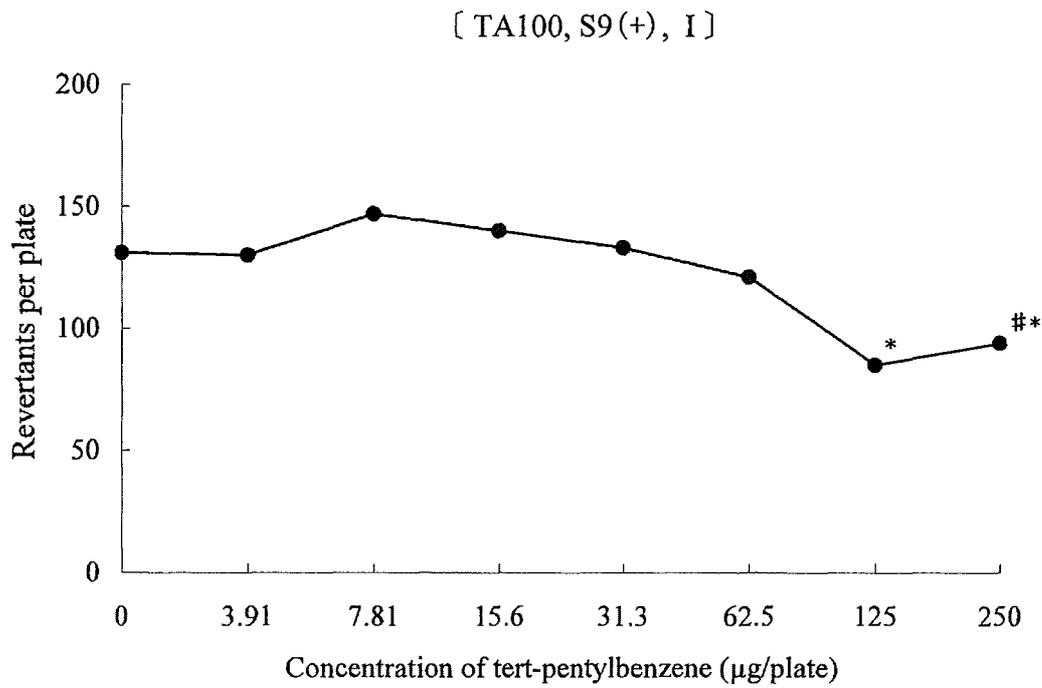


Figure 1-2 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA100 with metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment
 * : Growth inhibition

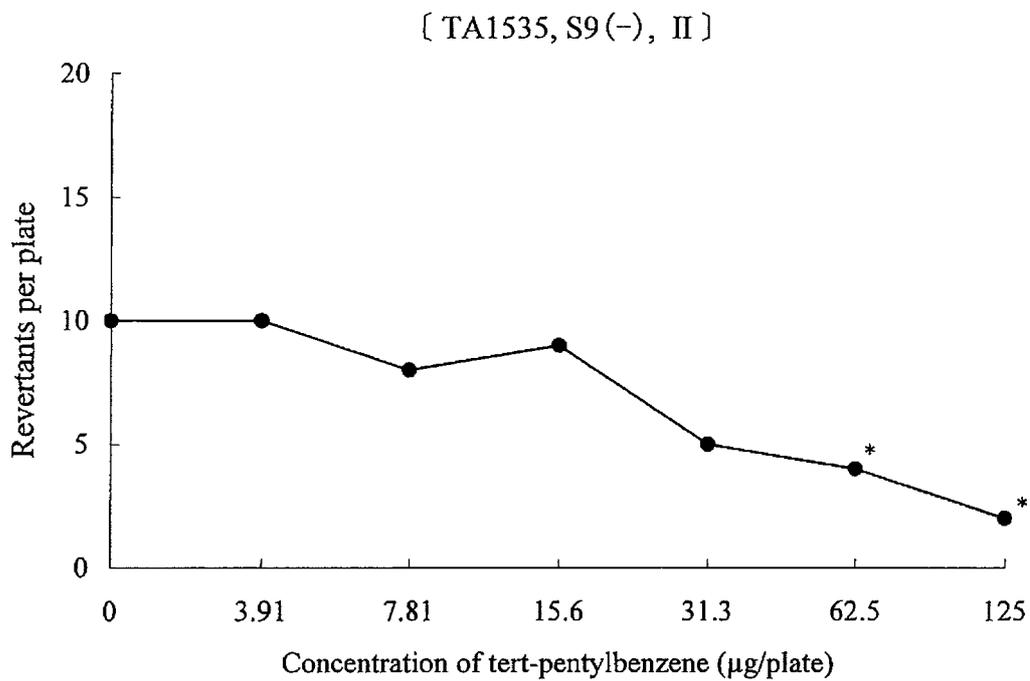
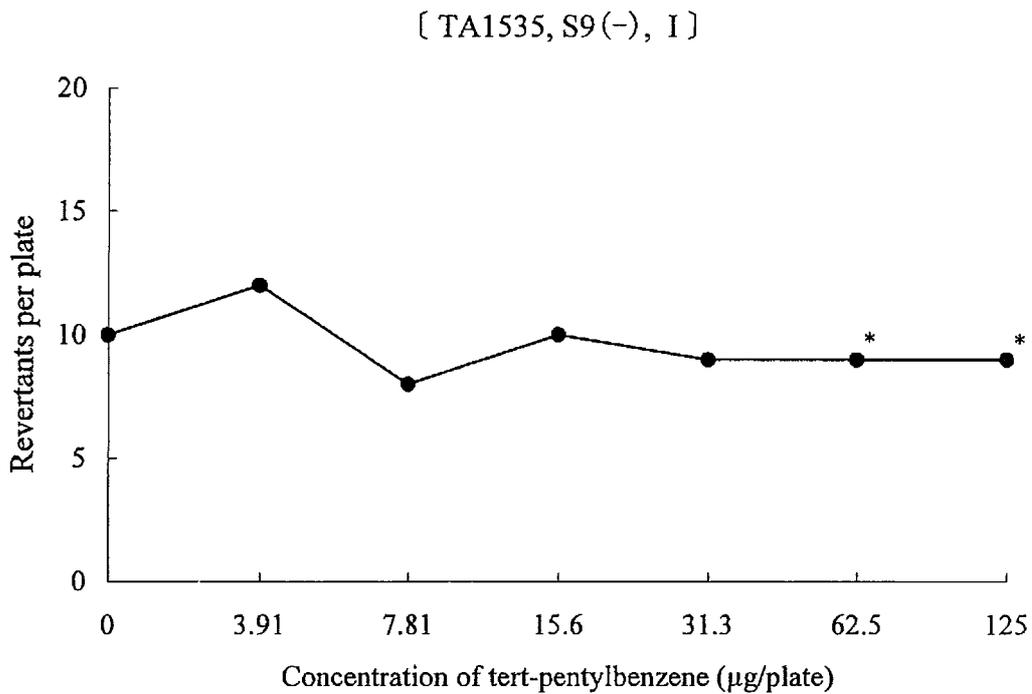


Figure 2-1 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA1535 without metabolic activation (dose-response curves)

* : Growth inhibition

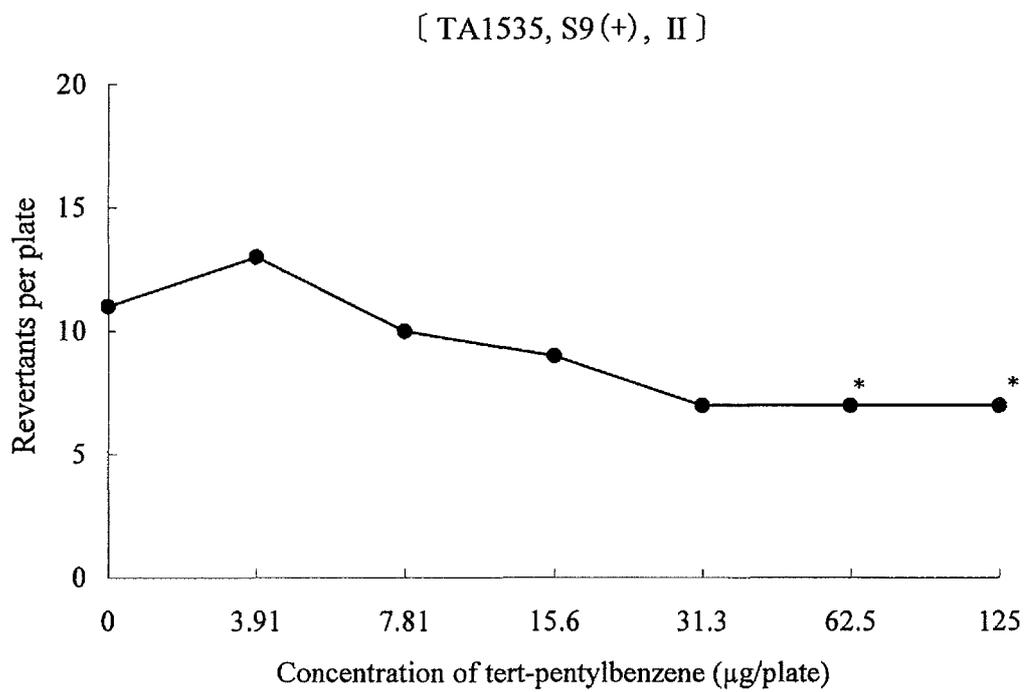
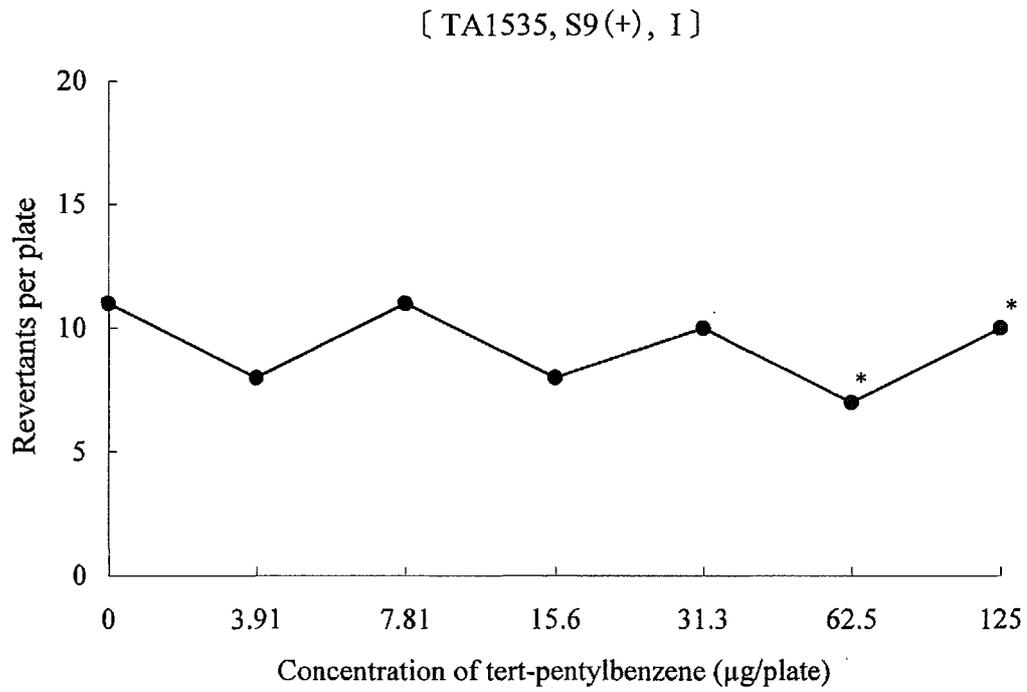


Figure 2-2 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA1535 with metabolic activation (dose-response curves)

* : Growth inhibition

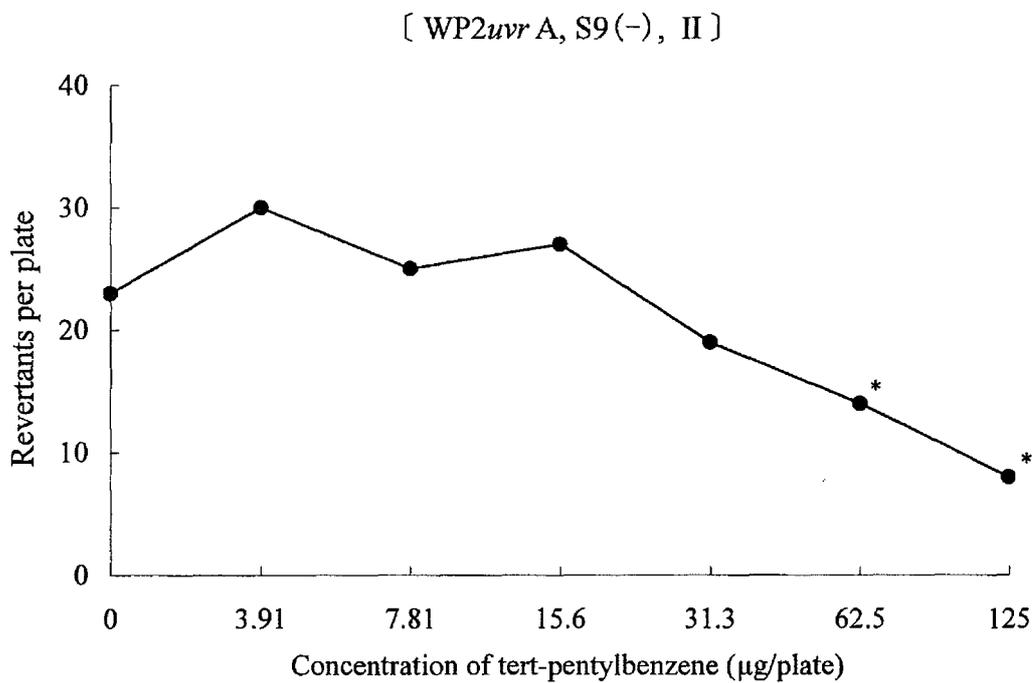
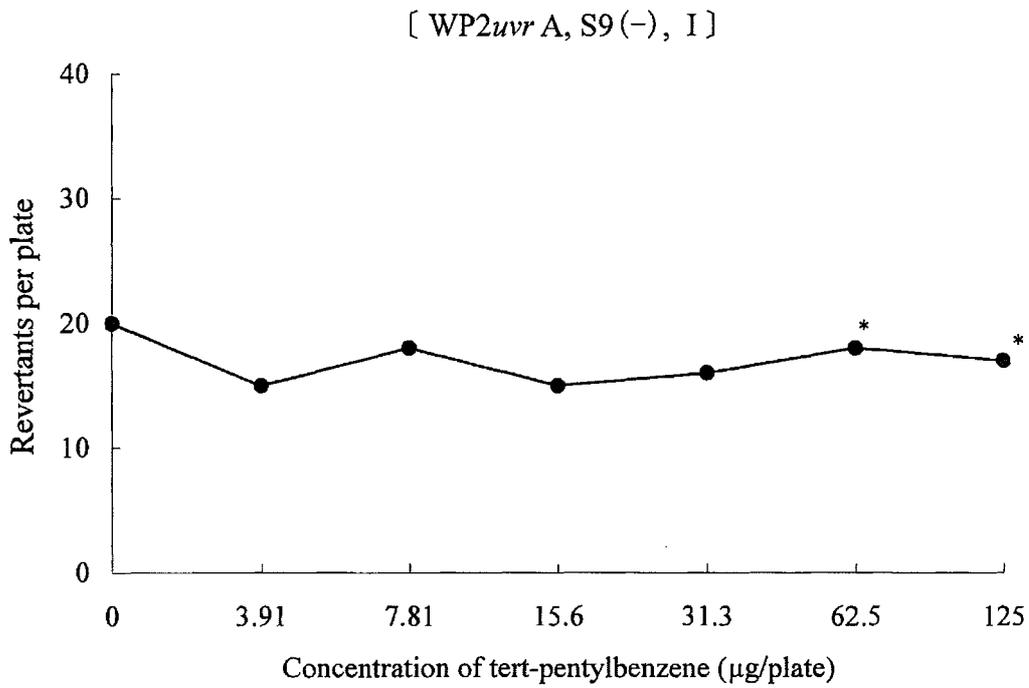


Figure 3-1 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Escherichia coli* WP2 uvr A without metabolic activation (dose-response curves)

* : Growth inhibition

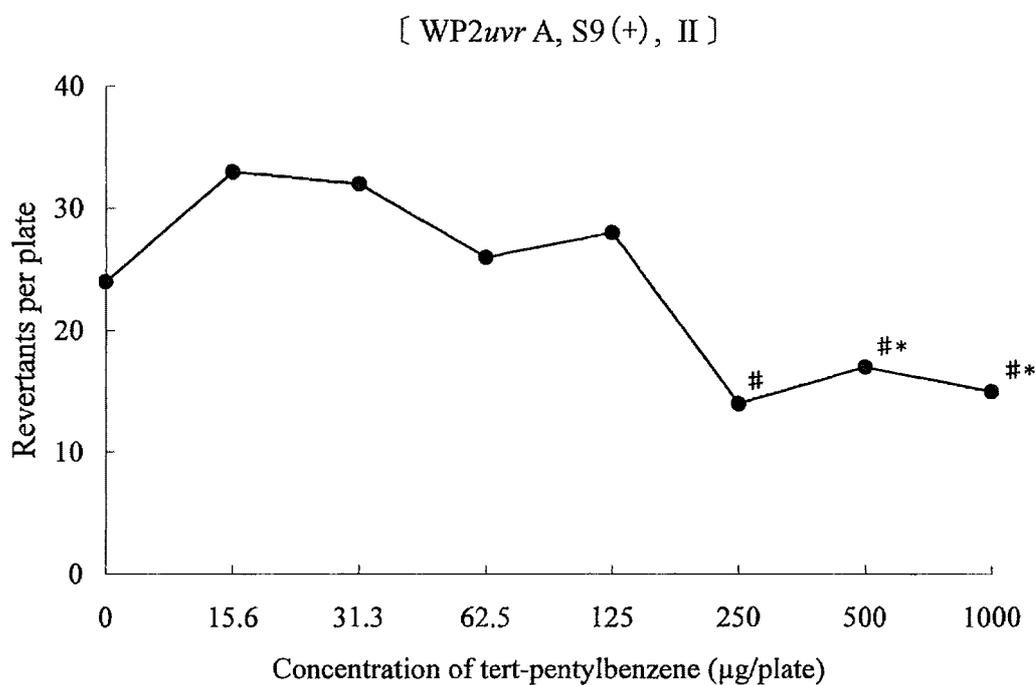
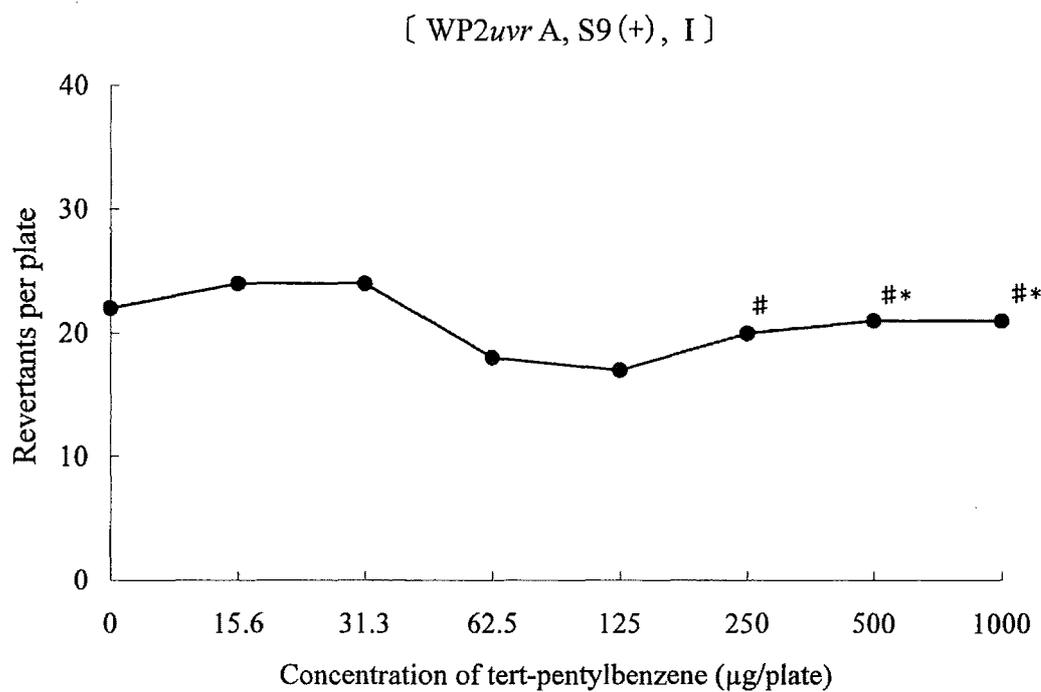
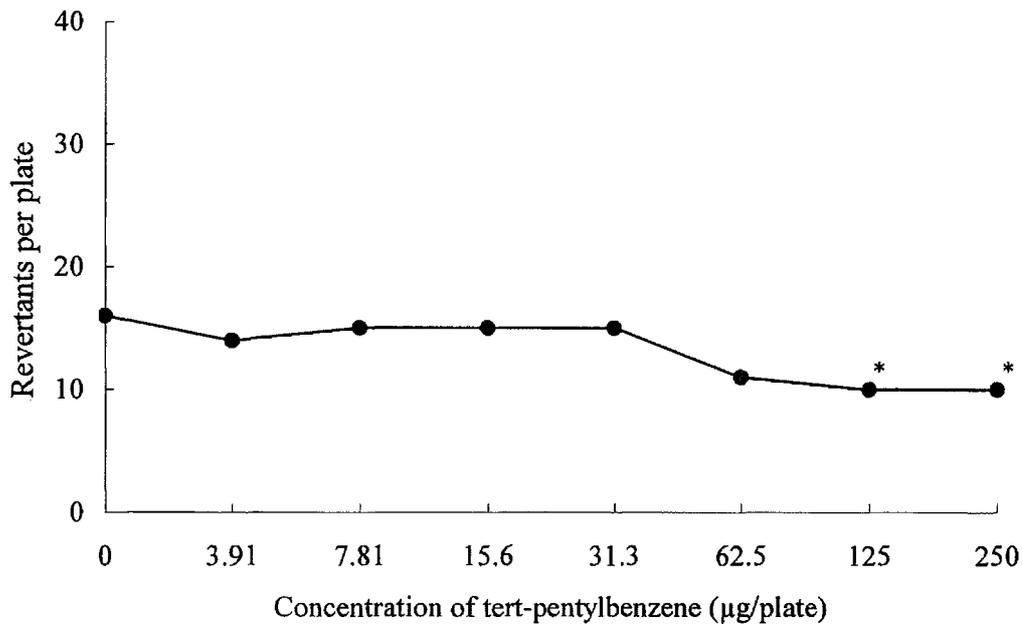


Figure 3-2 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Escherichia coli* WP2_{uvr} A with metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the of treatment
 * : Growth inhibition

[TA98, S9(-), I]



[TA98, S9(-), II]

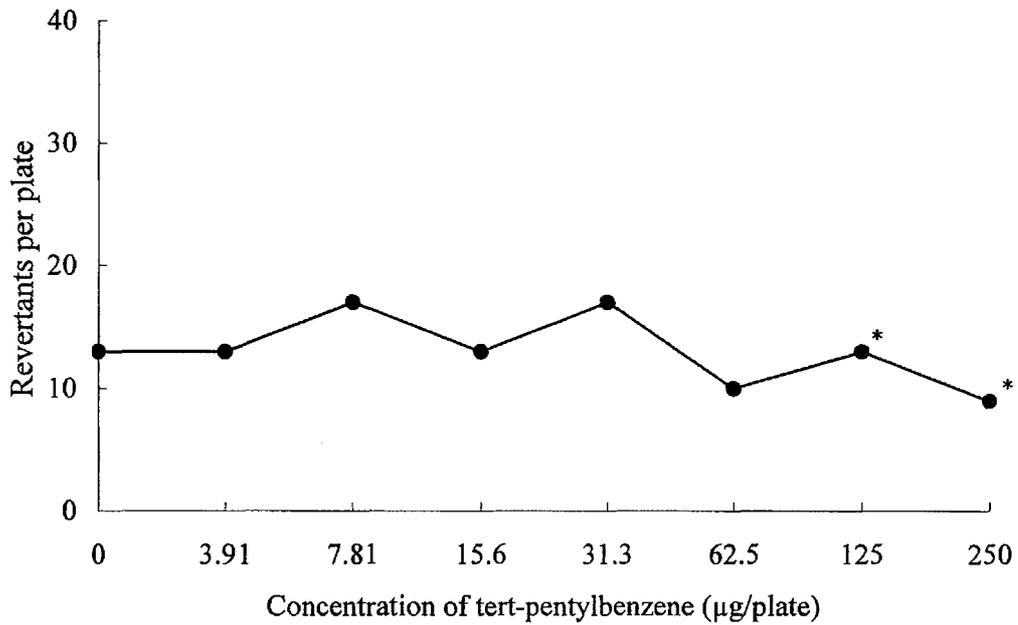


Figure 4-1 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (dose-response curves)

* : Growth inhibition

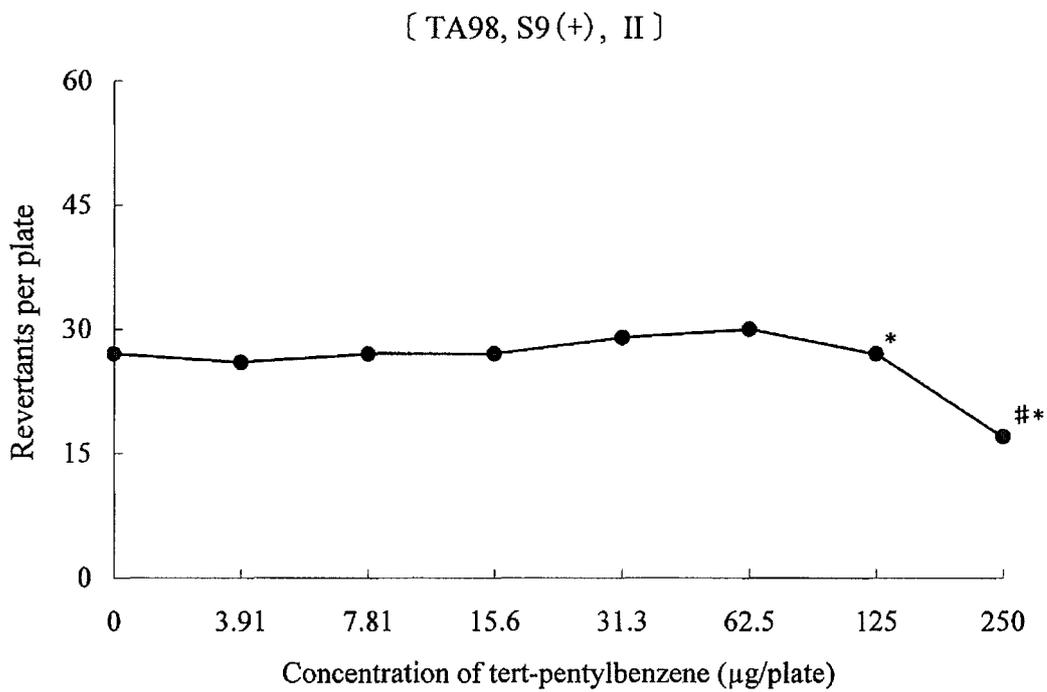
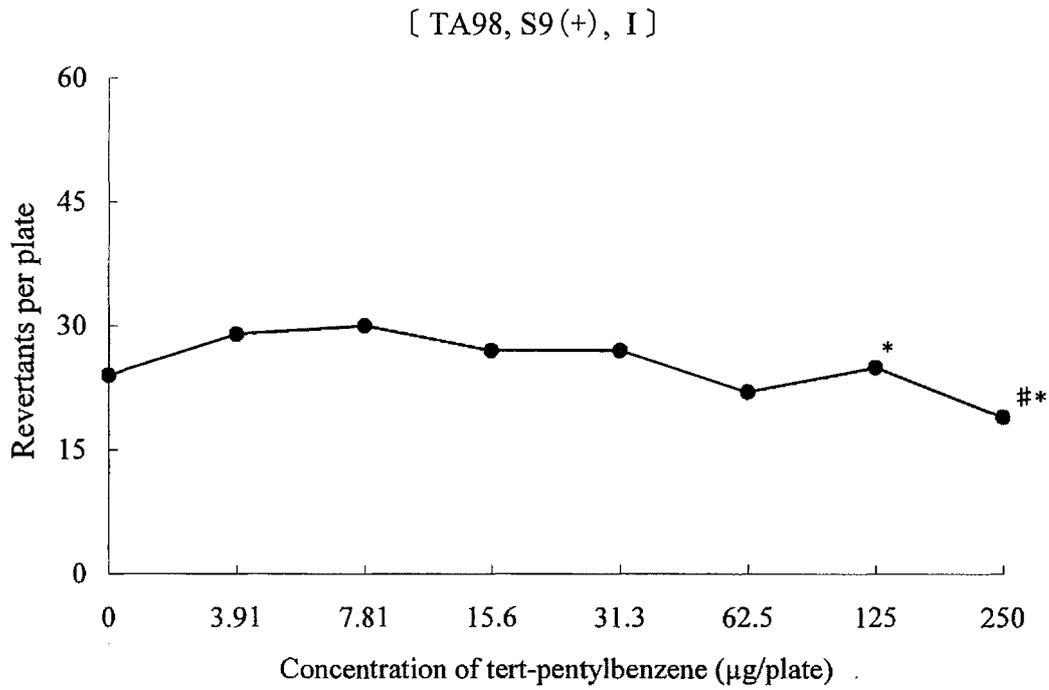
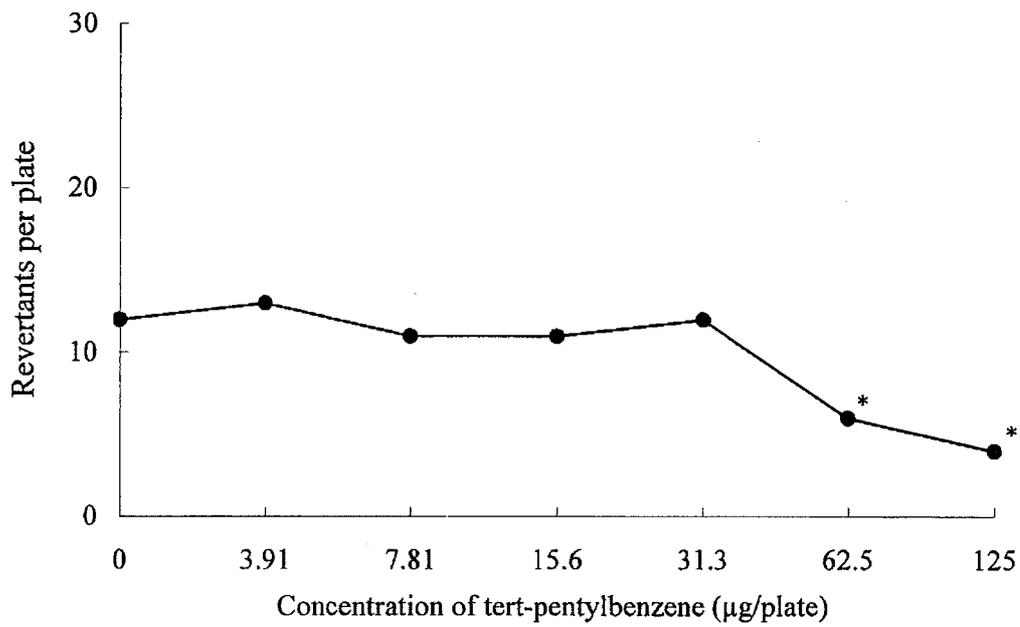


Figure 4-2 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA98 with metabolic activation (dose-response curves)

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

[TA1537, S9(-), I]



[TA1537, S9(-), II]

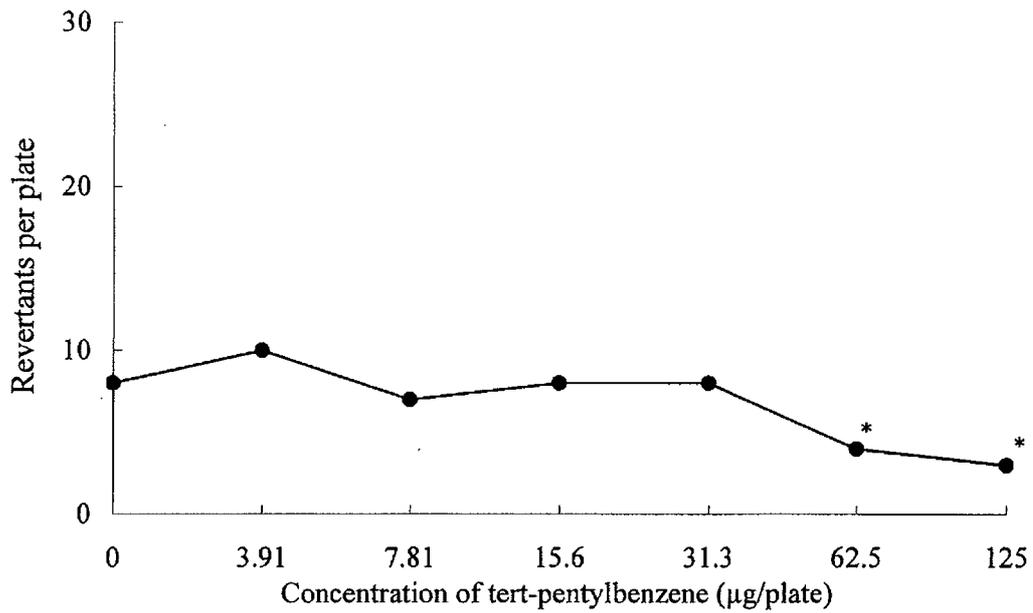


Figure 5-1 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA1537 without metabolic activation (dose-response curves)

* : Growth inhibition

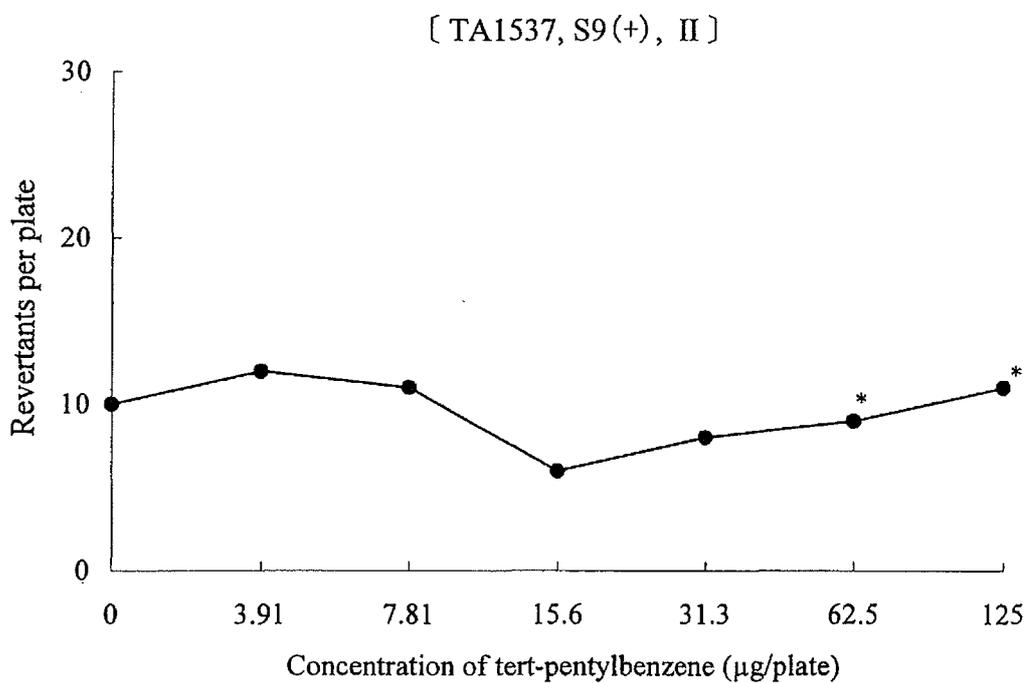
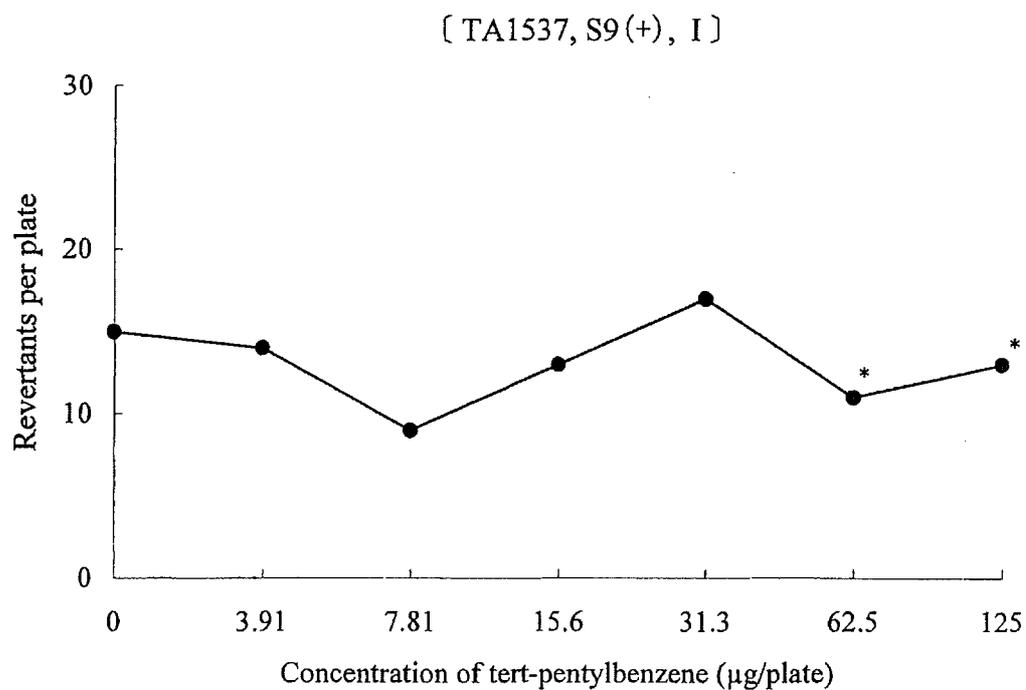


Figure 5-2 Reverse mutation test of tert-pentylbenzene in *Salmonella typhimurium* TA1537 with metabolic activation (dose-response curves)

* : Growth inhibition