ノニルフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：2471（115－036）

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目　　次

1. 要　　約　　1 頁

9. 被 験 物 質　　3
10. 試験材料および方法　　5
11. 試 験 結 果　　11
12. 考察および結論　　12
13. 参考とした資料　　13

Figures および Tables

Figure 1　Bacterial reversion test of nonylphenol in strain TA100　15
Figure 2　Bacterial reversion test of nonylphenol in strain TA1535　16
Figure 3　Bacterial reversion test of nonylphenol in strain WP2 *uvrA*　17
Figure 4　Bacterial reversion test of nonylphenol in strain TA98　18
Figure 5　Bacterial reversion test of nonylphenol in strain TA1537　19

Table 1　Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (1st trial) [direct method : -S9]　20
Table 2　Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (1st trial) [activation method : +S9]　21
Table 3　Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (2nd trial) [direct method : -S9]　22
Table 4　Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (2nd trial) [activation method : +S9]　23

1．要　　約：

本試験条件下において、ノニルフェノール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。

すなわち、ノニルフェノール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。
あらかじめ予備的な試験を実施し、本試験の用量を設定した。その結果、ノニルフェノール処理の場合、0.195 ～200 μg／プレートのいずれの試験用量においても、ラット肝ミクロソーム（Ｓ９）添加の有無にかかわらず、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。
一方、直接法および代謝活性化法での陽性対照物質は、すべての試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

9．被　験　物　質：

1）被験物質名　　ノニルフェノール（nonylphenol）

2）ロット番号

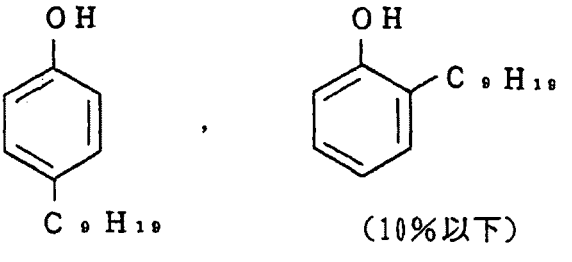
3）純　　度　　99.0%以上

4）提　供　先

5）保管条件　　強酸化剤から離しておく。
床面に沿って換気。
火気、熱源より遠ざける。
直射日光が当たらないように保管する。
防湿に留意する。
空気（酸素）との接触を極力避ける。
密栓して冷暗所に保管する。
消防法の危険物（第４類）に該当するもので次のものと同一場所に貯蔵しないこと。
a. 非危険物（指定可燃物の可燃性固体類又は可燃性液体類を除く）
b. 消防法の危険物（第２類の引火性固体を除く）

6）化　学　名　　ノニルフェノール

7）化学構造



8）分　子　式　　$C_{15}H_{24}O$

9）分　子　量　　220.35

10）CAS No.　　２５１５４－５２－３

11) 物質の状態	刺激臭のある無色～黄色の粘調液体
12) 溶　解　性	水（20℃）　0.3 g/100 mℓ
13) 融　　点	2℃
14) 沸　　点	295 ℃（101.3 KPa ）
15) 蒸　気　圧	＜0.01 KPa（20℃）
16) 取り扱い上の注意	裸火禁止。 第４類の危険物は、炎、火花、若しくは高温体との接近または加熱を避けるとともに、みだりに蒸気を発生させないこと。 容器を転倒させ、落下させ、衝撃を加え、または引き摺る等の乱暴な取り扱いをしてはならない。 ホースを切り離す時は受皿で液を回収する。少量でも漏れた場合はウエスで拭き取る。 ドラムの場合は開封後速やかに使用し、ドラム内に残りのある時は取り扱いの都度、窒素シール後密栓する。 バルブ、栓その他から洩れのない事を確認する。
17) 被験物質保管および残余被験物質の処理	試験終了後、残りの被験物質は染色体異常試験に使用する。

１０．試験材料および方法：

1）試験菌株

次の５種類の菌株を用いた。

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 *uvrA*（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　　から、また、大腸菌は昭和５８年３月１６日に　　から分与を受けた。平成６年１１月２５日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液 80 容量に対し、ジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；MERCK 社、独国；純度99.7%以上、Lot No. 309 K18572778 ）７容量の割合で加えて混合した後、小試料チューブ（NUNC社、デンマーク）に 0.2 ml ずつ分注した。液体窒素（LN_2）を用いて凍結した後、超低温フリーザー（MDF-390AT ；三洋電機特機株式会社、大阪府守口市）に－80℃で保存した。

2）培地の調製

a. 最少グルコース寒天平板培地（プレート）

試験には日清製粉株式会社（東京都中央区）から購入したプレート（テスメディア AN 培地）を用いた。本プレートは、下記の組成の溶液（Vogel-Bonner最少培地Ｅ等）をそれぞれオートクレーブ滅菌した後、γ線滅菌シャーレに 30 ml ずつ無菌的に分注したものである。

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２カリウム・無水塩	10	g
リン酸１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
グルコース	20	g
精製水	100	ml
寒天（Agar No.1）	15	g
精製水	700	ml

ロット番号および製造日等は、添付書類によると以下のとおりである。

(1) 培地のロット番号：　ＡＮ６３０ＬＪ
(2) 培地の製造日：　平成６年12月22日
(3) 寒天の製造元：　ＯＸＯＩＤ社、英国
(4) 寒天のロット番号：　７７０８３

b. トップアガー

寒天（Bacto-agar：DIFCO 社、米国；Lot No. 12528 ） 0.6%を含む 0.5%塩化ナトリウム水溶液をオートクレーブ滅菌した後、室温で保存した。使用時に加温溶解し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、あらかじめメンブレンフィルター（φ 0.22 μm：岩城硝子株式会社、東京都千代田区）を用いて濾過除菌しておいた 0.5 mM L-ヒスチジン（関東化学株式会社、東京中央区；Lot No. 210N1018）-0.5 mM D-ビオチン（関東化学株式会社、Lot No. 603E1730）水溶液を 1／10容量加え、45℃に保温した。一方、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L－トリプトファン（関東化学株式会社、Lot No. 904R6524）水溶液を 1／10容量加え、同様に45℃に保温した。

3) 試験菌株の前培養

試験菌株の前培養には 2.5%ニュートリエントブロス（OXOID 社：No. 2 ；Lot No. 232 51183 ）水溶液を使用した。内容量 200 mℓ の円筒容器に本培養液を 25 mℓ分注し、これに凍結保存した菌懸濁液を融解した後、マイクロピペットを用いて 50 μℓ接種した。培養開始までの間４℃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、埼玉県越谷市）を用い、37℃で８時間振盪（往復振盪： 120回／分）培養した。培養終了後に光電分光光度計（UV50-201：株式会社日立製作所、東京都千代田区）を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試　験	生菌数　（×10^9 /mℓ ）				
	TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
本試験（１回目）	4.82	5.33	4.29	4.44	2.11
本試験（２回目）	4.89	5.40	4.77	4.37	2.14

菌懸濁液については使用時まで室温で保存した。

4) S9 mix

キッコーマン株式会社（千葉県野田市）からS9 mix（Lot No. FSM-317 ）を購入し、使用時まで超低温フリーザー（－80℃）に保存した。製造後6カ月以内のS9 mixを使用した。

S9のロット番号、誘導物質および誘導方法等は、添付書類によると以下のとおりである。

a. ロット番号	RAA－317
b. 調製日	平成 6 年 10 月 27 日
c. 使用動物	ラット： Sprague-Dawley 系
d. 性／週齢	雄／7週齢
e. 体重	188 ～ 212 g
f. 誘導物質	Phenobarbital (PB) & 5,6－Benzoflavone (BF)
g. 投与量および回数	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）
h. 投与方法	腹腔内投与
i. 蛋白含量	26.9 mg/mℓ

また、S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mℓ 中の量
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
精製水	残量

5) 被験物質溶液の調製

DMSO（MERCK 社、Lot No. K20471078 404 ）に被験物質を溶解させ調製原液とした。調製原液を所定濃度に希釈した後、ただちに処理を行った。

6）試験用量

あらかじめ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 (μg/プレート)	S 9 mix	復帰突然変異コロニー数 TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
0	−	102	9	19	18	14
8.00	−	72*	9*	14	23*	2*
40.0	−	4*	0*	10*	9*	0*
200	−	0*	0*	5*	0*	0*
1000	−	3*	5*	4*	0*	0*
5000	−	4*	6*	4*	0*	0*
0	+	87	10	20	29	8
8.00	+	114	19	15	16	9
40.0	+	70*	17*	17	28	6*
200	+	45*	2*	12*	8*	3*
1000	+	2*	1*	17*	3*	1*
5000	+	38*	9*	9*	4*	5*

＊：試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。

本結果を基に、下表に示した用量を最高用量とし以下それぞれ６～７用量（公比２）を設定した。

試験	最高用量（μg／プレート） TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
直接法	12.5	12.5	50.0	12.5	12.5
代謝活性化法	50.0	50.0	200	200	50.0

7）対照試験

a. 溶媒対照

溶媒対照として、使用溶媒のDMSO（Lot No. K20471078 404 ）を用いた。

b. 陽性対照

DMSO（Lot No. 217 K15102078 ）を用いて陽性対照物質を溶解し、調製後は少量ずつに分注して凍結保存（－20℃）した。各菌株について、下記に示した用量で試験した。なお、試験用量の設定は、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」に準じた。

《直接法》	菌　株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	AF-2	0.01 μg／プレート
〃	TA98	〃	0.1 〃
〃	TA1535	NaN_3	0.5 〃
〃	TA1537	ACR	80.0 〃
大　腸　菌	WP2 *uvrA*	AF-2	0.01 〃

《代謝活性化法》	菌　株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	2-AA	1.0 μg／プレート
〃	TA98	〃	0.5 〃
〃	TA1535	〃	2.0 〃
〃	TA1537	〃	2.0 〃
大　腸　菌	WP2 *uvrA*	〃	10.0 〃

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、大阪府大阪市；純度98.0～ 102.0%、Lot No. SAJ0748 ）

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. APH4078 ）

ACR ：9-アミノアクリジン（ALDRICH 社、米国；純度98.0%、Lot No. CP01604TM ）

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. DCL3789 ）

c. 無菌試験

被験物質溶液（調製原液）およびＳ９ mixについて無菌試験を実施した。すなわち、0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液 500 μl に調製原液 100 μl を加えたもの、あるいは 500 μl のＳ９ mixに、あらかじめ45℃で保温しておいたトップアガー溶液 2 ml を加え、プレート上に注いだ後、軽く回転しながら一様に広げた。37℃、48時間の培養後、雑菌汚染の有無を確認した。本無菌試験は試験毎に実施し、調製原液およびＳ９ mixのいずれについても１枚のプレートを用いた。

8）被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

滅菌済み小試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を100 μℓ、次いで 0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.4）を500 μℓ（直接法の場合）、またはＳ９mix を500 μℓ（代謝活性化法の場合）を入れた。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 μℓを加え、ウォーターバスシェーカーを用い37℃で20分間振盪培養（プレインキュベーション）した。トップアガー 2 mℓ を加え、注意しながら混合した後、内容物をプレート上に注ぎ一様に広げた。重層した軟寒天が固化した後、プレートを上下転倒し恒温器を用いて、37℃の条件で48時間培養を続けた。

独立して試験を２回繰り返して実施した。

9）プレート数および識別

用量当たりそれぞれ３枚のプレートを使用した。

油性ペンで番号等を明記することにより、各プレートを識別した。

10）コロニー数の測定

被験物質の抗菌作用を確認するため、実体顕微鏡（×60）を用いてプレート上の試験菌株の生育阻害について調べた。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。

計測に際しては自動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、東京都福生市）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。

11）結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ２倍以上に増加し、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。

１１．試　験　結　果：

ノニルフェノール調製溶液ならびにＳ９ mixの無菌試験において、菌の増殖（雑菌汚染）は認められなかった。

1）本試験（１回目）

各用量における復帰突然変異コロニー数をFigure 1～5 および Table 1～2 に示した。
ノニルフェノール処理による試験菌株に対する生育阻害作用が、すべての試験菌株で直接法ならびに代謝活性化法の高用量群において観察された。
復帰突然変異コロニー数については、直接法、代謝活性化法とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。
陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の２倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。
Ｓ９ mix添加時、最高用量の200 μg／プレートにおいて僅かな白濁が生じたが、コロニー計数時では肉眼観察において析出物は認められなかった。

2）本試験（２回目）

各用量における復帰突然変異コロニー数をFigure 1～5 および Table 3～4 に示した。
ノニルフェノール処理による生育阻害作用が、直接法および代謝活性化法の各試験菌株の高用量群において認められた。
復帰突然変異により生じたコロニー数は直接法および代謝活性化法のいずれの試験菌株においても溶媒対照値の２倍を越えることはなかった。
陽性対照物質は各検定菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。
Ｓ９ mix添加時、50.0 μg/プレート以上の用量で用量相関的に白濁が生じたが、コロニー計数時では肉眼観察において析出物は認められなかった。

以上２回の試験において、直接法および代謝活性化法の両試験とも再現性が確認された。

１２．考察および結論：

ノニルフェノールの変異原性、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。
最高用量として各試験菌株の増殖を抑制する用量まで検討した。その結果、ノニルフェノール処理群では直接法および代謝活性化法のいずれにおいても、復帰突然変異コロニー数が溶媒対照と同等の値を示し、増加傾向は認められなかった。
一方、陽性対照群あるいは溶媒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、本試験が有効であることを示していた。

以上の試験結果から、本試験条件下においてノニルフェノールの微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

１３．参考とした資料：

- Ames, B. N., Lee, F.D. and Durston, W.E. : An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 782 ～ 786, 1973.

- Ames, B. N. *et al*, : Carcinogens are mutagens : A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 2,281 ～ 2,285, 1973.

- Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mut. Res., 31, 347 ～ 364, 1975.

- 矢作多貴江： 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について、蛋白質・核酸・酵素、20（13）、16～27, 1975.

- 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－、中央労働災害防止協会、1991.

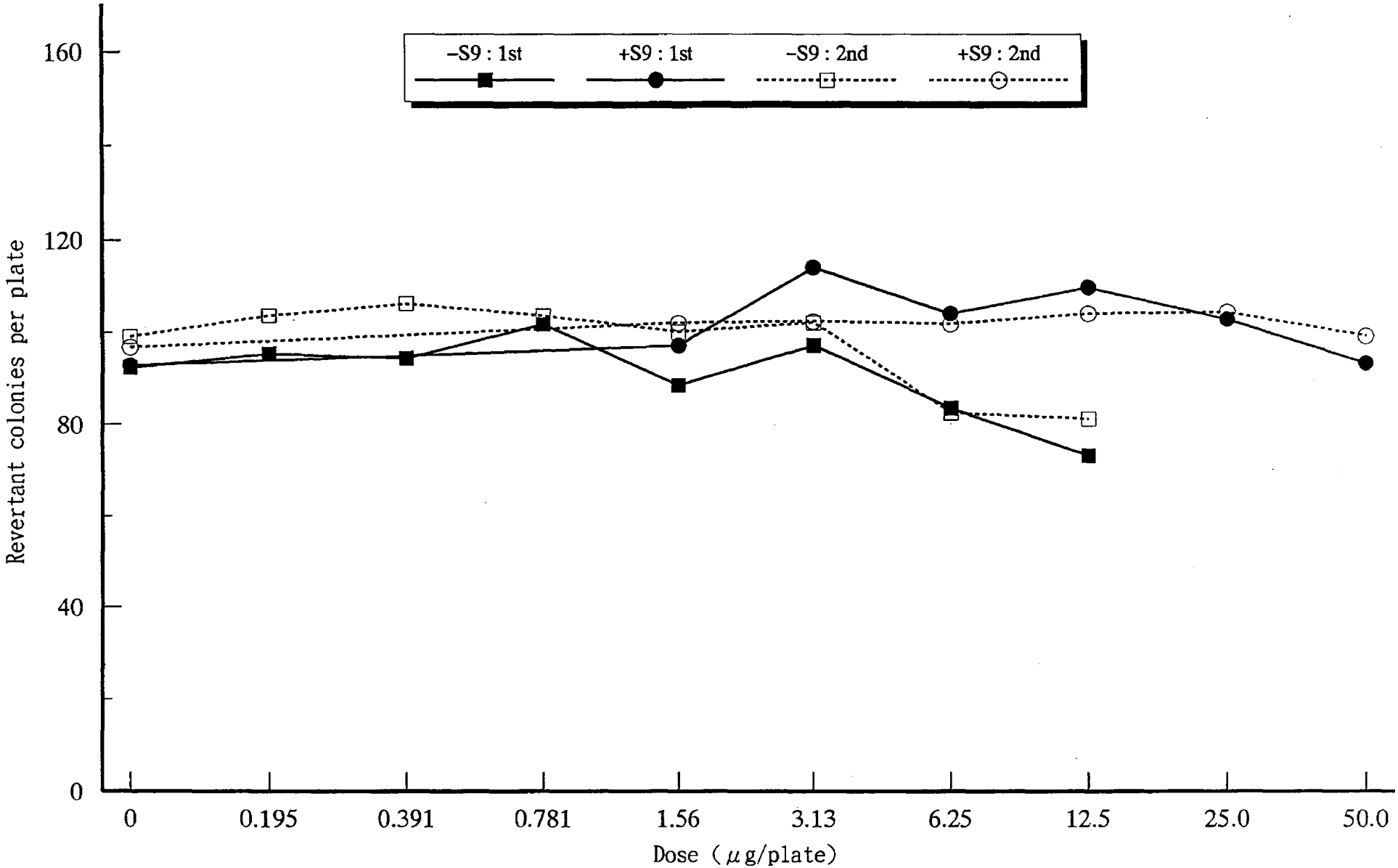


Figure 1. Bacterial reversion test of nonylphenol in strain TA100

Exp. No. 2471 (115-036)

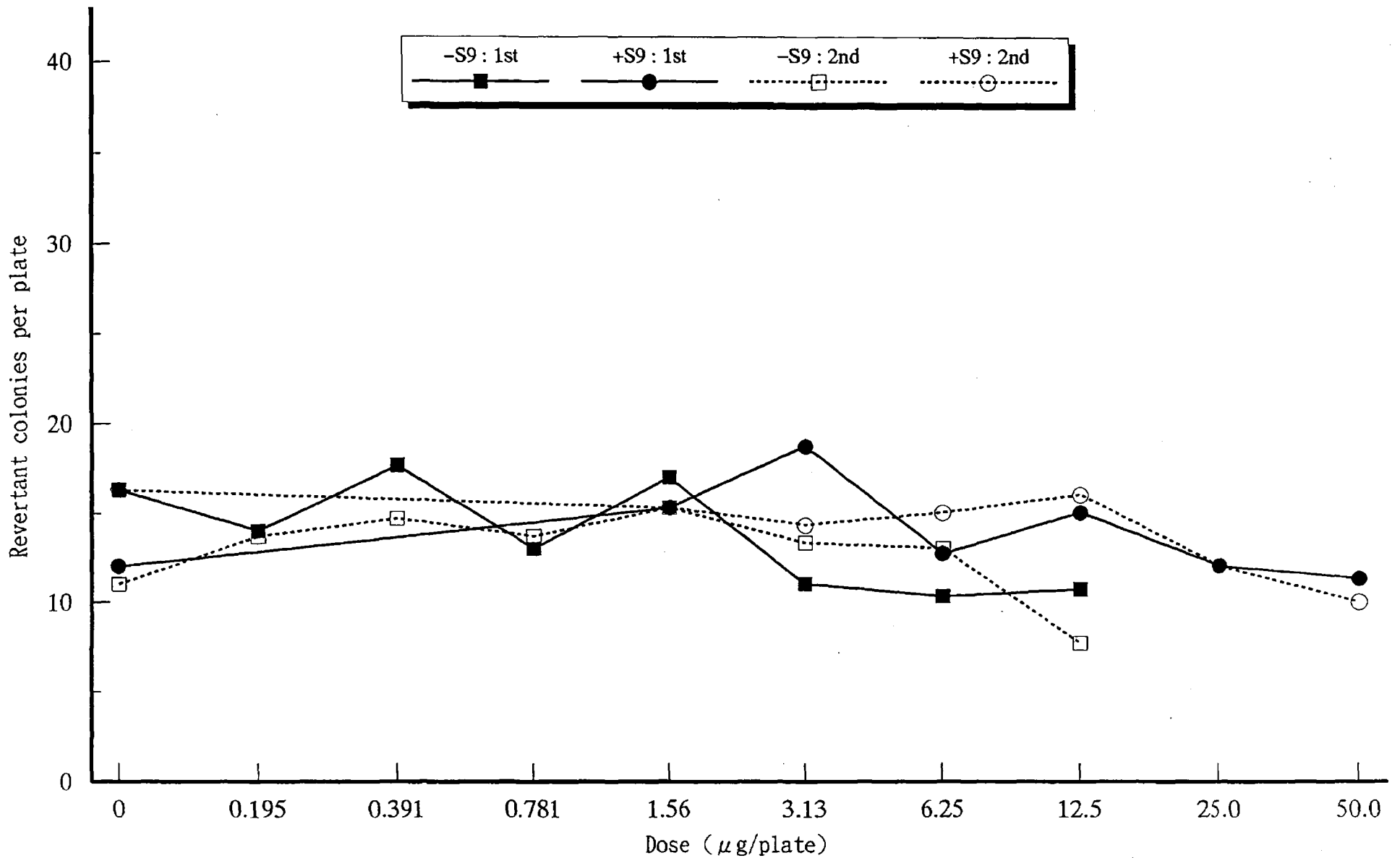


Figure 2. Bacterial reversion test of nonylphenol in strain TA1535

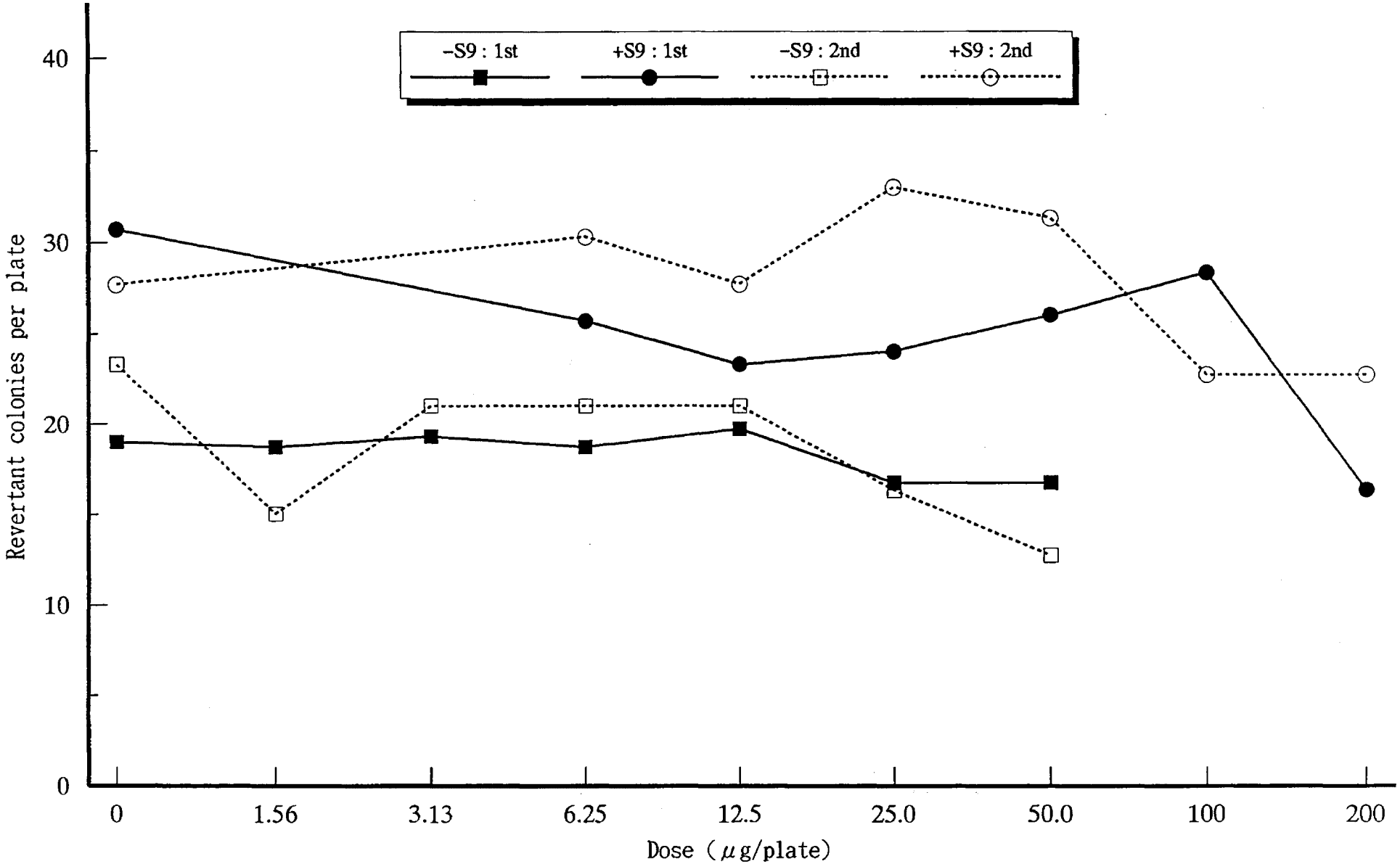


Figure 3. Bacterial reversion test of nonylphenol in strain WP2 *uvrA*

Exp. No. 2471 (115-036)

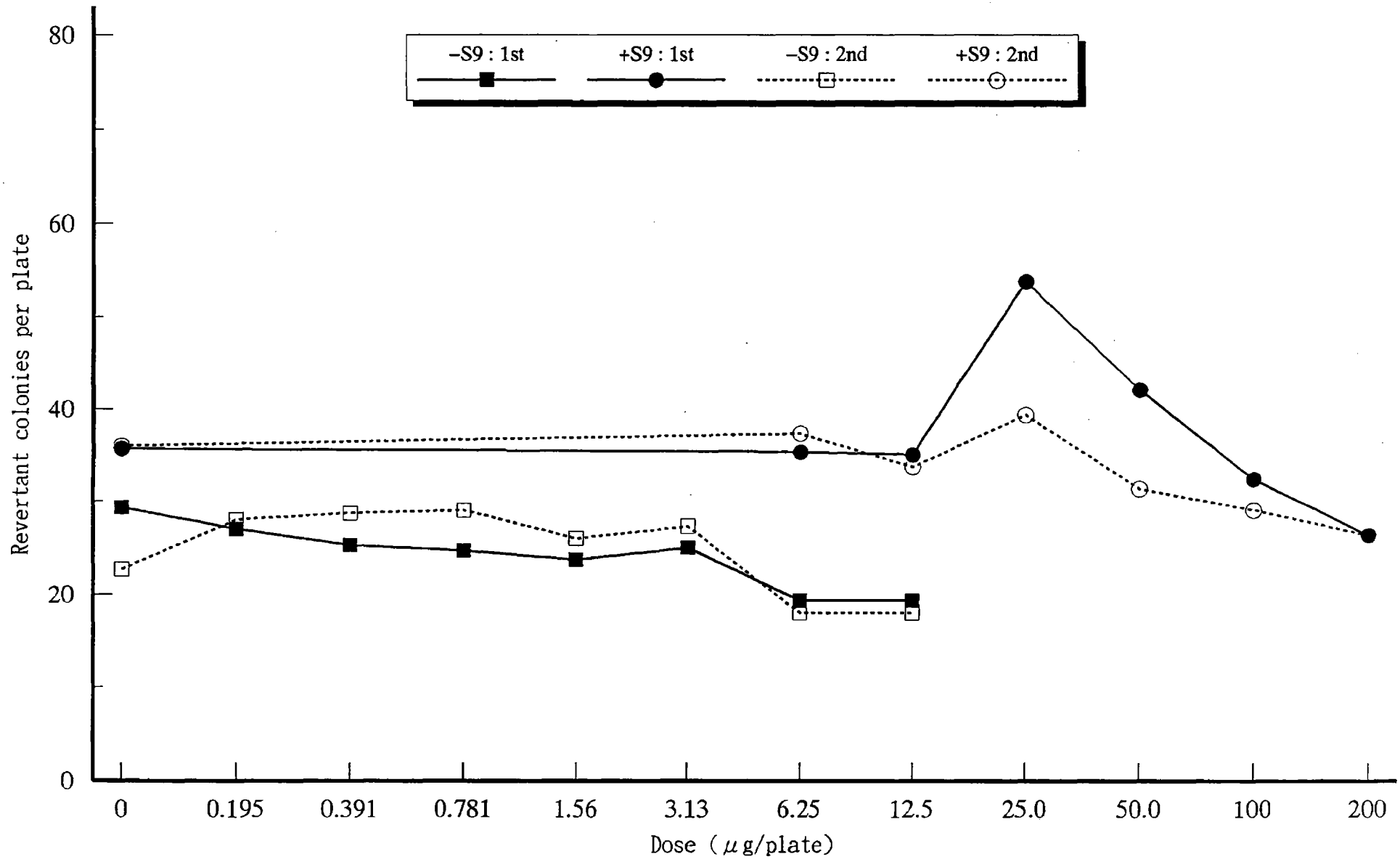


Figure 4. Bacterial reversion test of nonylphenol in strain TA98

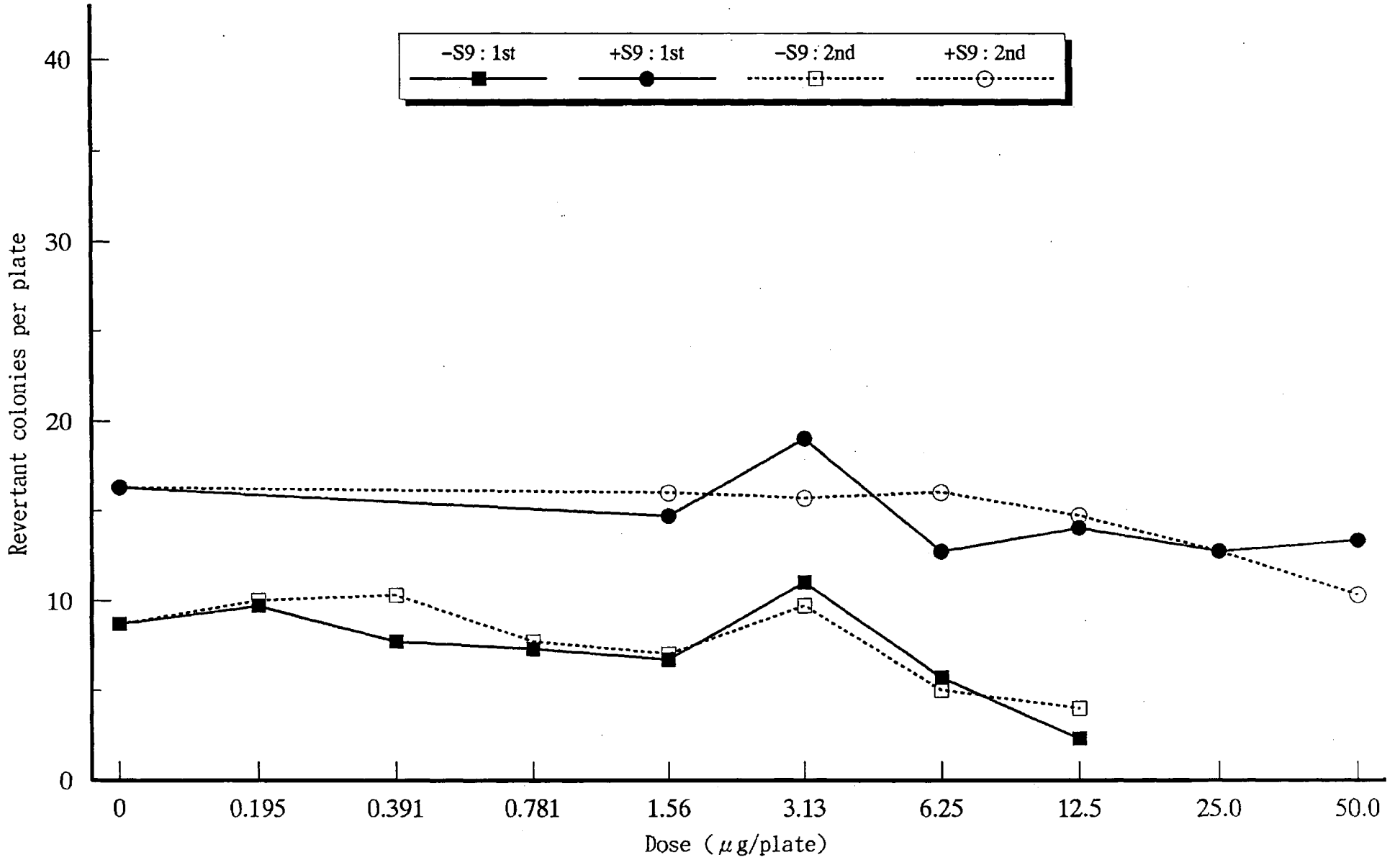


Figure 5. Bacterial reversion test of nonylphenol in strain TA1537

Table 1. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (1st trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.] TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	85 95 97 [92 ± 6]	13 17 19 [16 ± 3]	17 17 23 [19 ± 3]	24 31 33 [29 ± 5]	10 10 6 [9 ± 2]
Test sub.	0.195	111 84 91 [95 ± 14]	17 14 11 [14 ± 3]	–	26 27 28 [27 ± 1]	13 8 8 [10 ± 3]
	0.391	92 102 89 [94 ± 7]	13 23 17 [18 ± 5]	–	28 22 26 [25 ± 3]	7 9 7 [8 ± 1]
	0.781	95 109 101 [102 ± 7]	10 17 12 [13 ± 4]	–	31 16 27 [25 ± 8]	9 8 5 [7 ± 2]
	1.56	86 95 84 [88 ± 6]	21 14 16 [17 ± 4]	24 15 17 [19 ± 5]	27 16 28 [24 ± 7]	8 6 6 [7 ± 1]
	3.13	92 92 107 [97 ± 9]	13 11 9 [11 ± 2]	18 23 17 [19 ± 3]	30* 13* 32* [25 ± 10]	11* 10* 12* [11 ± 1]
	6.25	84* 84* 82* [83 ± 1]	10* 10* 11* [10 ± 1]	17 22 17 [19 ± 3]	19* 15* 24* [19 ± 5]	7* 6* 4* [6 ± 2]
	12.5	83* 61* 75* [73 ± 11]	13* 9* 10* [11 ± 2]	16 27 16 [20 ± 6]	17* 16* 25* [19 ± 5]	2* 1* 4* [2 ± 2]
	25.0	–	–	20* 14* 16* [17 ± 3]	–	–
	50.0	–	–	14* 22* 14* [17 ± 5]	–	–
Positive control		466 378 397[a)] [414 ± 46]	517 517 487[b)] [507 ± 17]	112 117 116[a)] [115 ± 3]	575 543 551[c)] [556 ± 17]	465 551 438[d)] [485 ± 59]

#: Solvent control * : Cell death was observed – : Not tested
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5μg/plate
c): AF-2, 0.1μg/plate d): ACR; 9-Aminoacridine, 80μg/plate

Table 2. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (1st trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.] TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	87 94 97 [93 ± 5]	9 15 12 [12 ± 3]	32 36 24 [31 ± 6]	37 34 36 [36 ± 2]	15 15 19 [16 ± 2]
Test sub.	1.56	105 94 92 [97 ± 7]	11 21 14 [15 ± 5]	–	–	19 13 12 [15 ± 4]
	3.13	112 116 114 [114 ± 2]	15 18 23 [19 ± 4]	–	–	17 18 22 [19 ± 3]
	6.25	126 95 91 [104 ± 19]	13 16 9 [13 ± 4]	25 21 31 [26 ± 5]	38 36 32 [35 ± 3]	17 12 9 [13 ± 4]
	12.5	124 105 100 [110 ± 13]	16 13 16 [15 ± 2]	17 20 33 [23 ± 9]	35 34 36 [35 ± 1]	17 18 7 [14 ± 6]
	25.0	100 114 94 [103 ± 10]	16 8 12 [12 ± 4]	25 17 30 [24 ± 7]	54 50 57 [54 ± 4]	9 12 17 [13 ± 4]
	50.0	87* 97* 95* [93 ± 5]	8* 10* 16* [11 ± 4]	21 28 29 [26 ± 4]	46 42 38 [42 ± 4]	9* 17* 14* [13 ± 4]
	100	–	–	30* 24* 31* [28 ± 4]	34* 32* 31* [32 ± 2]	–
	200	–	–	16* 15* 18* [16 ± 2]	25* 25* 29* [26 ± 2]	–
Positive control		866 793 819[a)] [826 ± 37]	483 592 538[b)] [538 ± 55]	811 845 824[c)] [827 ± 17]	374 306 338[d)] [339 ± 34]	186 149 170[b)] [168 ± 19]

: Solvent control * : Cell death was observed – : Not tested
a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate

Table 3. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.] TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	106 93 98 [99 ± 7]	11 10 12 [11 ± 1]	27 19 24 [23 ± 4]	18 26 24 [23 ± 4]	10 7 9 [9 ± 2]
Test sub.	0.195	100 108 103 [104 ± 4]	14 14 13 [14 ± 1]	–	24 29 31 [28 ± 4]	10 12 8 [10 ± 2]
	0.391	105 105 109 [106 ± 2]	16 15 13 [15 ± 2]	–	25 29 32 [29 ± 4]	10 12 9 [10 ± 2]
	0.781	103 106 102 [104 ± 2]	15 11 15 [14 ± 2]	–	27 28 32 [29 ± 3]	9 7 7 [8 ± 1]
	1.56	94 107 99 [100 ± 7]	16 14 16 [15 ± 1]	15 14 16 [15 ± 1]	30 23 25 [26 ± 4]	10 5 6 [7 ± 3]
	3.13	101* 104* 101* [102 ± 2]	13 13 14 [13 ± 1]	23 19 21 [21 ± 2]	24 25 33 [27 ± 5]	7* 9* 13* [10 ± 3]
	6.25	79* 83* 85* [82 ± 3]	11* 14* 14* [13 ± 2]	20 24 19 [21 ± 3]	20* 14* 20* [18 ± 3]	6* 5* 4* [5 ± 1]
	12.5	82* 76* 85* [81 ± 5]	5* 8* 10* [8 ± 3]	19 21 23 [21 ± 2]	16* 16* 22* [18 ± 3]	3* 6* 3* [4 ± 2]
	25.0	–	–	16* 18* 15* [16 ± 2]	–	–
	50.0	–	–	12* 13* 13* [13 ± 1]	–	–
Positive control		432 403 397[a)] [411 ± 19]	460 557 453[b)] [490 ± 58]	127 134 100[c)] [120 ± 18]	526 527 473[c)] [509 ± 31]	613 591 463[d)] [556 ± 81]

: Solvent control * : Cell death was observed – : Not tested
a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01μg/plate b) : NaN_3; Sodium azide, 0.5μg/plate
c) : AF-2, 0.1μg/plate d) : ACR; 9-Aminoacridine, 80μg/plate

Table 4. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (2nd trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.] TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	97 91 102 [97 ± 6]	16 18 15 [16 ± 2]	29 32 22 [28 ± 5]	40 39 29 [36 ± 6]	17 16 16 [16 ± 1]
Test sub.	1.56	102 99 105 [102 ± 3]	16 14 16 [15 ± 1]	–	–	17 14 17 [16 ± 2]
	3.13	97 100 110 [102 ± 7]	14 15 14 [14 ± 1]	–	–	14 19 14 [16 ± 3]
	6.25	99 106 100 [102 ± 4]	14 17 14 [15 ± 2]	32 25 34 [30 ± 5]	40 31 41 [37 ± 6]	17 14 17 [16 ± 2]
	12.5	114 102 96 [104 ± 9]	15 17 16 [16 ± 1]	21 33 29 [28 ± 6]	37 33 31 [34 ± 3]	13 16 15 [15 ± 2]
	25.0	105* 101* 107* [104 ± 3]	15 14 7 [12 ± 4]	36 30 33 [33 ± 3]	40 44 34 [39 ± 5]	13 13 12 [13 ± 1]
	50.0	102* 101* 94* [99 ± 4]	8* 11* 11* [10 ± 2]	31 31 32 [31 ± 1]	30 29 35 [31 ± 3]	14* 8* 9* [10 ± 3]
	100	–	–	24* 21* 23* [23 ± 2]	28* 22* 37* [29 ± 8]	–
	200	–	–	24* 23* 21* [23 ± 2]	33* 22* 24* [26 ± 6]	–
Positive control		646 660 634[a)] [647 ± 13]	360 414 432[b)] [402 ± 37]	611 786 719[c)] [705 ± 88]	316 276 335[d)] [309 ± 30]	140 127 127[b)] [131 ± 8]

: Solvent control * : Cell death was observed – : Not tested
a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate