

2005年12月21日

ジエチルピフェニルの  
細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

[目 次]

	頁
要 約 .....	1
試験目的 .....	2
材料および方法 .....	3
1. 被験物質 .....	3
2. 陽性対照物質 .....	3
3. 検定菌 .....	4
4. 試験材料 .....	4
5. 被験物質調製液の調製 .....	6
6. 試験操作 .....	6
7. 判定 .....	8
結果および考察 .....	9
1. 用量設定試験 .....	9
2. 本試験 .....	9
参考文献 .....	11
Table 1 Cytotoxicity of diethylbiphenyl in bacteria .....	12
Table 2 Mutagenicity of diethylbiphenyl in bacteria (I) .....	13
Table 3 Mutagenicity of diethylbiphenyl in bacteria (II) .....	14
Figure 1 Dose response curves in mutagenicity test (I) of diethylbiphenyl in bacteria .....	15
Figure 2 Dose response curves in mutagenicity test (II) of diethylbiphenyl in bacteria .....	16

[要 約]

ジエチルピフェニルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用い、プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加および添加条件で試験を行った。

用量設定試験を 50.0、150、500、1500 および 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の5段階の用量を設定して行ったところ、S9 mix 無添加および添加条件とも、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかったが、S9 mix 添加条件において、TA1535 では 150  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の用量で、TA98 では 50.0  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の用量で復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。

これらの結果に基づき、最高用量をすべての検定菌で 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  とし、公比 2 で 5～8 用量 (39.1～5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) を設定して、2 回の本試験を行った。その結果、用いたすべての検定菌において、S9 mix の添加の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、ジエチルピフェニルは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

## [試 験 目 的]

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、ジエチルビフェニルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法<sup>1)</sup>により実施した。

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」（昭和 62 年 3 月 31 日、環保業第 237 号、薬発第 306 号、62 基局第 303 号、一部改正平成 9 年 10 月 31 日、環保安第 287 号、衛生第 127 号、平成 09・10・31 基局第 2 号）および「OECD 化学物質試験法ガイドライン 471／細菌を用いる復帰突然変異試験」（1997 年 7 月 21 日採択）に基づき、「化学物質 GLP」（平成 12 年 3 月 1 日改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号）を遵守して実施した。

[材料および方法]

1. 被験物質

被験物質であるジエチルビフェニル [略号：DEBP、英名：diethylbiphenyl、ロット番号： 、製造： ] は淡黄色透明液体であり、

から提供を受けた。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。被験物質は、使用時まで密閉容器に入れ、遮光して冷蔵（実測値：2～8℃）で保管した。

被験物質提供者において、実験終了後に返却した被験物質をガスクロマト方により非 GLP 下で分析した結果、被験物質は実験期間中安定であったことが確認された（Appendix 2）。なお、被験物質に関する資料（非 GLP データ）は、被験物質提供者の責任に基づき確認、提供された資料であることから、試験結果の信頼性を損なうものではないと判断した。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌に用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれを結果の各 Table 中に示した。

名称	略称	製造者	ロット番号（購入日）	純度
2-(2-フル)-3-(5-ニトロ-2-フル)アクリルアミド	AF2	和光純薬工業(株)	CKQ1402 (2001年9月13日)	99.0%
アジ化ナトリウム	SA	和光純薬工業(株)	ELE2329 (2001年5月15日)	99.2%
9-アミノグリシン	9AA	Sigma Chem. Co.	106F06681 (2001年5月15日)	97%以上
2-アミノアントラセン	2AA	和光純薬工業(株)	DWK5667 (2001年9月13日)	97.4%

AF2、9AA および 2AA はジメチルスルホキシド（DMSO、和光純薬工業(株)、ロット番号：PKJ4820）に、SA は日局注射用水（(株)大塚製薬工場、製造番号：K2H76）に溶解し、所定の濃度に調製した後、冷凍保存（設定温度：-20℃）し、調製後 6 か月以内のものを  
用時に解凍して用いた。

### 3. 検定菌

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、試験には、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* を用いた。

*S. typhimurium* の 4 菌株は 1997 年 8 月 7 日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は 1997 年 4 月 9 日に、いずれも日本バイオアッセイ研究センターのより分与された。

*S. typhimurium* の 4 菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異<sup>2)</sup>、*E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異<sup>3)</sup> を指標とした変異原性の検出系である。

検定菌は凍結保存 (設定温度: -80℃) したものをを用いた。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV 感受性、膜変異 (*rfa*)、アンピシリン耐性因子 pKM101 (プラスミド) の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロス No. 2 (Oxoid Ltd.) を入れた L 字型試験管に解凍した菌液を 12 μL (TA100、TA1535 および TA98) あるいは 6 μL (TA1537 および WP2 *uvrA*) 加え、37℃で 10 時間往復振とう培養したものを試験菌液とした。試験菌液は、分光光度計 (榊島津製作所、型式: UV-120-02) により 660 nm の吸光度を測定し、測定値が 2002 年度の背景データの平均値の 90% 以上であることを確認した。試験に用いた検定菌の生菌数を段階希釈法により求め、Appendix 3 に示した。

### 4. 試験材料

#### 1) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号: DZA4AO01、2003 年 10 月 24 日製造) を用いた。なお、培地 1 L あたりの組成は以下のとおりで、径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

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
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g

グルコース	20	g
大洋寒天（清水食品㈱）	15	g

## 2) トップアガー

以下の水溶液（A）に（B）または（C）を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー（Difco Lab.）	0.6 w/v%
塩化ナトリウム	0.5 w/v%
(B) <i>Salmonella typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L
(C) <i>Escherichia coli</i> 用	
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

## 3) 肝臓エキス（S9）

キッコーマン㈱で製造したもの（ロット番号：RAA-494、2003年12月12日製造）を購入して用いた。

- ①動物 Sprague-Dawley 系ラット、雄：7週齢
- ②誘導方法 フェノバルビタール（PB）および 5,6-ベンゾフラボン（BF）を、1日目 PB 30 mg/kg、2日目 PB 60 mg/kg、3日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4日目 PB 60 mg/kg 腹腔内投与した。
- ③S9 調製 5日目に致死させて摘出した肝臓を生理食塩液で灌流したのち、3倍量の 0.15 mol/L 塩化カリウム溶液を加えてホモジナイズし、9000×g で 10 分間遠沈して得た上清画分。
- ④保存条件 ディープフリーザー（設定温度：-80℃）で保存した。製造後 6 か月以内に使用した。

## 4) S9 mix の組成および調製

S9 mix 1 mL あたりの組成は以下のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

成 分	S9 mix 1 mL 中の量	調製濃度
S9	0.1 mL	10 vol%
0.2 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 mL	100 µmol/mL
Cofactor*	0.38 mL	—————
┌ 塩化カリウム	—————	33 µmol/mL
│ グルコース-6-リン酸	—————	5 µmol/mL
│ NADH	—————	4 µmol/mL
│ NADPH	—————	4 µmol/mL
0.4 mol/L 塩化マグネシウム溶液	0.02 mL	8 µmol/mL

\* : Cofactor は、上記の成分を混合して調製した後、凍結保存 (設定温度: -80℃) し、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

## 5. 被験物質調製液の調製

被験物質は 50.0 mg/mL の濃度で水に不溶であるが DMSO には溶解することから、試験に際しては被験物質を DMSO (和光純薬工業㈱、ロット番号: PKJ4820) に溶解して最高用量の調製液 (50.0 mg/mL) を調製し、以下同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。調製濃度を以下に示す。

用量設定試験: 0.500、1.50、5.00、15.0、50.0 mg/mL

本 試 験: 0.391、0.781、1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0 mg/mL

なお、被験物質調製液の調製時に、発熱、発泡および変色は認められなかった。

## 6. 試験操作

### 1) 試験操作

試験は、プレインキュベーション法により、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加条件および哺乳動物 (ラット) のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する S9 mix 添加条件で行った。

小試験管中に被験物質調製液 0.1 mL、S9 mix 無添加条件では 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、S9 mix 添加条件では S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、37℃で 20 分間プレインキュベーションしたのち、トップアガー 2 mL を加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、被験物質調製液の代わりに使用溶媒 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。陰性およ



び陽性対照の結果については、同時に実施した他試験と共通に用いた。

培養は 37℃で 48 時間行い、発生した復帰変異コロニー数を、コロニーアナライザー（システムサイエンス㈱、CA-11）または目視により算定した。なお、2 回の本試験においては、培養終了後からコロニー計測までの 1 日間、合成培地平板を冷蔵（設定温度：4℃）で保管した。被験物質に由来する沈澱の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照では 3 枚ずつ、各用量については 1 枚ずつとした。また、本試験においては、両対照および各用量につき 3 枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。陰性および陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

上記の方法により、用量設定試験は 1 回、本試験は 2 回実施し、結果の再現性を確認した。

## 2) 試験用量

用量設定試験においては、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、最高用量を 5000 µg/plate とし、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 5 段階の用量を設定した。

本試験においては、用量設定試験で生育阻害が認められなかったことから、最高用量をすべての検定菌について 5000 µg/plate とした。なお、S9 mix 添加条件において、TA1535 では 78.1、156、313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate の 7 用量、TA98 では 39.1、78.1、156、313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate の 8 用量を設定し、それ以外の検定菌および S9 mix 無添加条件では 313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate の 5 段階の用量を設定した。

## 3) 無菌試験

最高用量の被験物質調製液 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ合成培地平板上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

## 4) 識別法

平板側面に識別番号を記載した。S9 mix 無添加条件は黒、S9 mix 添加条件は赤の色で識別した。菌の識別は、TA100 は 0、TA1535 は 5、TA98 は 9、TA1537 は 7、WP2 *uvrA*

は W とした。用量の識別は、菌の識別番号の右に用量の低いものから 1、2、3、・・・と記入した。陰性対照および陽性対照は、菌の識別番号の左に各々 0 および P と記入して識別した。

## 7. 判定

用いた 5 種の検定菌のうち、1 種以上の検定菌の S9 mix 無添加条件あるいは S9 mix 添加条件において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、陰性対照値のそれに比べて 2 倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、本試験系において変異原性を有する（陽性）と判定することとした。

[予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態  
及び試験計画書に従わなかったこと]

本試験期間中に、「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。

## [結果および考察]

### 1. 用量設定試験

最高用量を 5000 µg/plate とし、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 5 段階の用量を設定して用量設定試験を行った (Table 1)。その結果、S9 mix 無添加および添加条件ともに、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈澱は、S9 mix 無添加条件では 1500 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 添加条件ではすべての用量で認められた。なお、S9 mix 添加条件において、TA1535 では 150 µg/plate の用量で、TA98 では 50.0 µg/plate の用量で復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量をすべての検定菌で 5000 µg/plate とした。

### 2. 本試験

上記の最高用量に基づき、S9 mix 添加条件において、TA1535 では公比 2 で 7 用量 (78.1 ~ 5000 µg/plate)、TA98 では公比 2 で 8 用量 (39.1 ~ 5000 µg/plate) を設定し、それ以外の検定菌および S9 mix 無添加条件では公比 2 で 5 用量 (313 ~ 5000 µg/plate) を設定して 2 回の本試験 (本試験 I および本試験 II) を行った (Table 2, 3, Figure 1, 2)。その結果、S9 mix 無添加および添加条件ともに、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈澱は、S9 mix 無添加条件では本試験 I では 2500 µg/plate 以上の用量で、本試験 II では 1250 µg/plate 以上の用量で認められ、S9 mix 添加条件では 2 回の本試験とも、すべての用量で認められた。

復帰変異コロニー数は、用いたすべての検定菌において、S9 mix の添加の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

すべての試験において、最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、陰性対照値および陽性対照値は、ともに背景データ (Appendix 4) の変動範囲内 (平均値  $\pm 3 \times$  標準偏差) であったことから、本試験系の有効性が確認された。

なお、ジエチルビフェニルについては、当研究所で実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験でも陰性の<sup>4)</sup>結果が得られている。また、関連物質である Biphenyl については、復帰突然変異試験では陰性、染色体異常試験ではマウス S9 を用いた代謝活性化法で陽性の<sup>5、6)</sup>結果が報告されている。4-Ethylbiphenyl については復帰突然変異試験および染色体異常試験ともに陰性の結果が報告されている<sup>7)</sup>。

以上の結果に基づき、ジエチルビフェニルは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

[参 考 文 献]

- 1) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagano, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp. 273-285.
- 2) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 3) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 4) 「ジエチルピフェニルのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験」, 試験計画番号 : G-03-055 (2004) (投稿準備中) .
- 5) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修 : 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 社団法人化学物質安全・情報センター, 東京, pp. 229-230 (1986).
- 6) 祖父尼俊雄 監修 : 染色体異常試験データ集改訂 1998 年版, 株式会社エル・アイ・シー, 東京, p. 77 (1999).
- 7) 厚生省生活衛生局企画課生活安全対策室 監修 : 化学物質毒性試験報告 Vol.7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, pp. 601-632 (1999).

Table 1 Cytotoxicity of diethylbiphenyl in bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	94	114	106	12	9	11	22	25	20	21	23	27	13	12	9
		( 105 ± 10 )			( 11 ± 2 )			( 22 ± 3 )			( 24 ± 3 )			( 11 ± 2 )		
	50.0	96			3			17			19			5		
	150	131			3			16			21			6		
	500	92			12			25			17			5		
	1500 †	102			9			21			17			6		
	5000 †	147			10			22			16			4		
S9 mix (+)	0	142	132	141	11	5	9	20	23	26	32	21	27	11	14	15
		( 138 ± 6 )			( 8 ± 3 )			( 23 ± 3 )			( 27 ± 6 )			( 13 ± 2 )		
	50.0 †	117			8			20			41			13		
	150 †	134			16			10			31			11		
	500 †	141			5			22			29			7		
	1500 †	140			10			19			27			6		
	5000 †	108			8			22			36			5		
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (µg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg / plate)	1			2			10			0.5			2		
Positive control S9 mix (-)	Number of colonies / plate	504	497	519	570	633	588	164	158	154	430	449	496	291	357	506
		( 507 ± 11 )			( 597 ± 32 )			( 159 ± 5 )			( 458 ± 34 )			( 385 ± 110 )		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	714	701	720	309	341	291	972	957	892	407	398	422	227	235	227
		( 712 ± 10 )			( 314 ± 25 )			( 940 ± 43 )			( 409 ± 12 )			( 230 ± 5 )		

Negative control, Dimethyl sulfoxide

The purity of the test substance was 97.74%.

This substance contained 2.26% unspecified as impurity.

AF2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Table 2 Mutagenicity of diethylbiphenyl in bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	122	113	127	12	12	11	13	18	18	29	21	38	11	13	4	
		( 121 ± 7 )	( 12 ± 1 )	( 16 ± 3 )	( 29 ± 9 )	( 9 ± 5 )											
	313	115	104	97	9	8	9	26	28	18	26	29	22	7	7	5	
		( 105 ± 9 )	( 9 ± 1 )	( 24 ± 5 )	( 26 ± 4 )	( 6 ± 1 )											
	625	123	115	101	8	6	9	24	26	27	23	19	18	5	8	3	
		( 113 ± 11 )	( 8 ± 2 )	( 26 ± 2 )	( 20 ± 3 )	( 5 ± 3 )											
	1250	113	103	111	9	8	8	25	16	24	26	18	16	5	8	5	
		( 109 ± 5 )	( 8 ± 1 )	( 22 ± 5 )	( 20 ± 5 )	( 6 ± 2 )											
	2500 †	126	129	121	14	10	7	30	33	20	28	22	27	4	10	5	
		( 125 ± 4 )	( 10 ± 4 )	( 28 ± 7 )	( 26 ± 3 )	( 6 ± 3 )											
	5000 †	133	164	148	6	8	6	26	25	24	22	14	19	6	5	6	
		( 148 ± 16 )	( 7 ± 1 )	( 25 ± 1 )	( 18 ± 4 )	( 6 ± 1 )											
S9 mix (+)	0	125	128	141	12	8	4	38	20	33	44	23	28	16	16	12	
		( 131 ± 9 )	( 8 ± 4 )	( 30 ± 9 )	( 32 ± 11 )	( 15 ± 2 )											
	39.1 †	NT	NT	NT	37	37	49	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
					( 41 ± 7 )												
	78.1 †	NT	11	10	4	NT	NT	NT	36	43	41	NT	NT	NT	NT	NT	
				( 8 ± 4 )					( 40 ± 4 )								
	156 †	NT	15	9	6	NT	NT	NT	43	33	34	NT	NT	NT	NT	NT	
				( 10 ± 5 )					( 37 ± 6 )								
	313 †	112	109	130	4	9	9	25	22	22	31	34	27	10	15	14	
	( 117 ± 11 )	( 7 ± 3 )	( 23 ± 2 )	( 31 ± 4 )	( 13 ± 3 )												
	625 †	145	129	132	5	8	4	25	31	28	30	34	21	3	11	6	
		( 135 ± 9 )	( 6 ± 2 )	( 28 ± 3 )	( 28 ± 7 )	( 7 ± 4 )											
	1250 †	149	134	106	8	6	2	20	22	24	34	35	31	11	8	8	
		( 130 ± 22 )	( 5 ± 3 )	( 22 ± 2 )	( 33 ± 2 )	( 9 ± 2 )											
	2500 †	135	134	146	6	5	8	18	16	25	30	27	28	9	8	9	
		( 138 ± 7 )	( 6 ± 2 )	( 20 ± 5 )	( 28 ± 2 )	( 9 ± 1 )											
	5000 †	114	115	117	4	14	4	35	27	21	38	31	36	7	7	6	
		( 115 ± 2 )	( 7 ± 6 )	( 28 ± 7 )	( 35 ± 4 )	( 7 ± 1 )											
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg / plate)	1			2			10			0.5			2			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	639	624	709	341	331	356	922	957	957	387	410	425	207	211	243	
		( 657 ± 45 )	( 343 ± 13 )	( 945 ± 20 )	( 407 ± 19 )	( 220 ± 20 )											

Negative control, Dimethyl sulfoxide

The purity of the test substance was 97.74%.

This substance contained 2.26% unspecified as impurity.

AF2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, Precipitate was observed on the surface of agar plates.

NT, Not tested

Table 3 Mutagenicity of diethylbiphenyl in bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	131	114	107	14	13	13	26	22	24	14	14	15	6	6	10
		( 117 ± 12 )			( 13 ± 1 )			( 24 ± 2 )			( 14 ± 1 )			( 7 ± 2 )		
	313	104	139	105	6	8	10	15	14	22	18	22	17	8	6	3
		( 116 ± 20 )			( 8 ± 2 )			( 17 ± 4 )			( 19 ± 3 )			( 6 ± 3 )		
	625	92	114	98	10	8	5	19	22	21	19	14	15	5	4	1
		( 101 ± 11 )			( 8 ± 3 )			( 21 ± 2 )			( 16 ± 3 )			( 3 ± 2 )		
	1250 †	103	120	95	9	8	11	24	23	26	19	11	15	2	7	5
		( 106 ± 13 )			( 9 ± 2 )			( 24 ± 2 )			( 15 ± 4 )			( 5 ± 3 )		
	2500 †	145	132	134	7	17	14	17	22	24	14	18	15	4	5	2
		( 137 ± 7 )			( 13 ± 5 )			( 21 ± 4 )			( 16 ± 2 )			( 4 ± 2 )		
	5000 †	162	140	150	10	10	10	32	29	22	16	15	13	3	1	4
		( 151 ± 11 )			( 10 ± 0 )			( 28 ± 5 )			( 15 ± 2 )			( 3 ± 2 )		
S9 mix (+)	0	103	106	125	8	8	10	26	28	34	18	22	30	14	15	11
		( 111 ± 12 )			( 9 ± 1 )			( 29 ± 4 )			( 23 ± 6 )			( 13 ± 2 )		
	39.1 †	NT			NT			NT			31	37	31	NT		
											( 33 ± 3 )					
	78.1 †	NT			16	12	7	NT			35	43	29	NT		
					( 12 ± 5 )						( 36 ± 7 )					
	156 †	NT			5	10	6	NT			28	26	22	NT		
					( 7 ± 3 )						( 25 ± 3 )					
	313 †	126	105	100	8	11	5	18	29	26	27	24	24	11	20	10
	( 110 ± 14 )			( 8 ± 3 )			( 24 ± 6 )			( 25 ± 2 )			( 14 ± 6 )			
625 †	129	126	130	6	7	7	15	34	19	18	22	20	7	7	17	
	( 128 ± 2 )			( 7 ± 1 )			( 23 ± 10 )			( 20 ± 2 )			( 10 ± 6 )			
1250 †	141	135	143	3	8	8	22	28	23	23	26	24	9	8	9	
	( 140 ± 4 )			( 6 ± 3 )			( 24 ± 3 )			( 24 ± 2 )			( 9 ± 1 )			
2500 †	139	116	116	5	6	9	30	23	26	18	22	24	11	10	6	
	( 124 ± 13 )			( 7 ± 2 )			( 26 ± 4 )			( 21 ± 3 )			( 9 ± 3 )			
5000 †	147	130	113	6	4	14	18	17	28	17	25	15	9	11	10	
	( 130 ± 17 )			( 8 ± 5 )			( 21 ± 6 )			( 19 ± 5 )			( 10 ± 1 )			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (µg/ plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg/ plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	653	704	705	359	328	350	1026	1011	838	404	384	412	224	211	213
		( 687 ± 30 )			( 346 ± 16 )			( 958 ± 104 )			( 400 ± 14 )			( 216 ± 7 )		

Negative control, Dimethyl sulfoxide

The purity of the test substance was 97.74%.

This substance contained 2.26% unspecified as impurity.

AF2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, Precipitate was observed on the surface of agar plates.

NT, Not tested



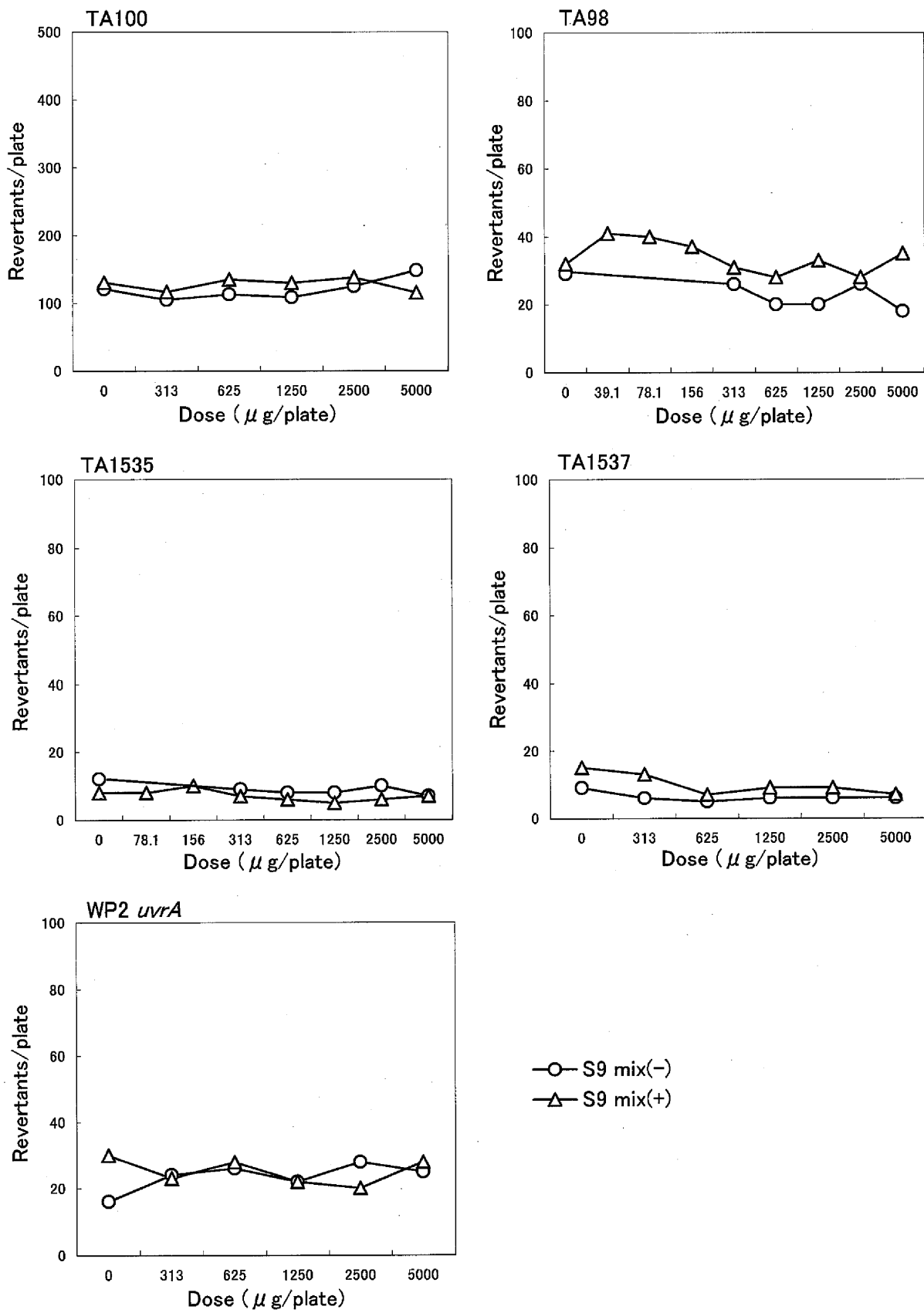


Figure 1 Dose response curves in mutagenicity test (I) of diethylbiphenyl in bacteria

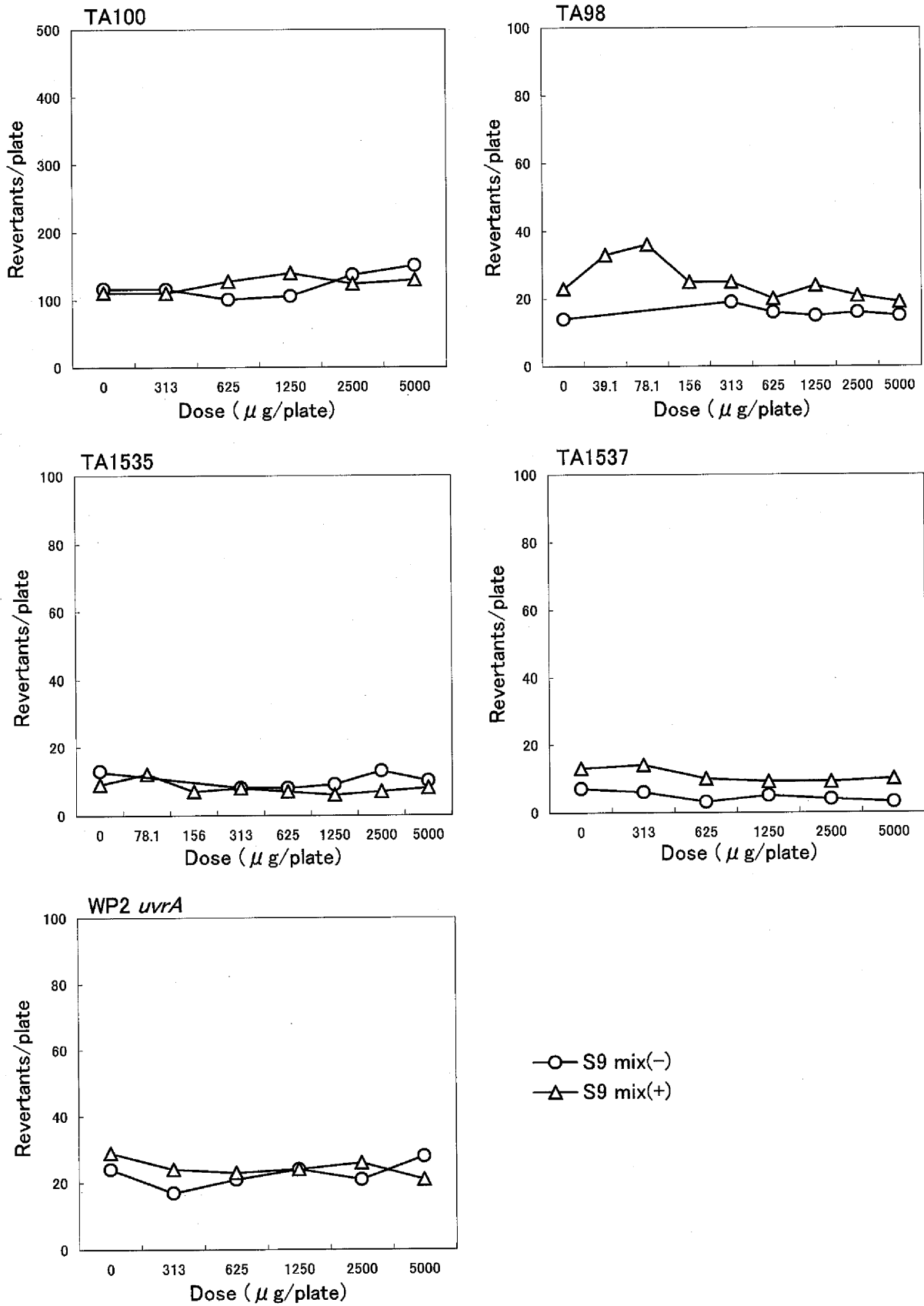


Figure 2 Dose response curves in mutagenicity test (II) of diethylbiphenyl in bacteria