

食薬セ研第 12-1898 号

2002 年 3 月 29 日

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-  
ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールの  
細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬局審査管理課 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
緒 言 -----	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 -----	3
4. 試験材料 -----	4
5. 被験物質調製液の調製 -----	5
6. 試験操作 -----	5
7. 判定 -----	6
結果および考察 -----	7
1. 用量設定試験 -----	7
2. 本試験 -----	7
参考文献 -----	9
Tables      1～3	
Figures     1、2	

## [要 約]

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールについて、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 50.0~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の範囲に公比約3で5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に、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。

これらの結果に基づき、すべての検定菌で最高用量を 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  とし、公比2で5用量 (313~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) 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。

以上の結果から、2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールは、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。

[ 緒 言 ]

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、2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールについて、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、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) における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>、ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) における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。

試験は、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。

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)に準拠し、「化学物質 GLP」(昭和 59 年 3 月 31 日、環保業第 39 号、薬発第 229 号、59 基局第 85 号、改訂昭和 63 年 11 月 18 日、環企研第 233 号、衛生第 38 号、63 基局第 823 号、平成 12 年 3 月 1 日一部改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号)に基づいて行った。

## [材料および方法]

### 1. 被験物質

被験物質である 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾール [英名: 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole、ロット番号: 製造 ]は淡黄色粉末固体であり、 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、使用時まで室温保管した。

### 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。

検定菌ごと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。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

(AF2、和光純薬工業(株) ロット番号:WTQ0059、純度 98%以上)

アジ化ナトリウム (SA、和光純薬工業(株) ロット番号:ELE2329、純度 98%以上)

9-アミノアクリジン (9AA、Sigma Chem. Co.ロット番号:106F06681、純度 97%以上)

2-アミノアントラセン (2AA、和光純薬工業(株) ロット番号:DLH6052、純度 90%以上)

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: ELL5600 および SEG4422) に、SA は超純水に溶解し、所定の濃度に調製した後-20℃で凍結保存し、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

上記のガイドラインに従って、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. 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 日に日本バイオアッセイ研究センターの から分与された。

検定菌は-80℃で凍結保存したものを用い、特性確認は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た。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Unipath Ltd.) を入れた L 字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37°Cで10時間往復振とう培養したものを試験菌液とした。分光光度計 (株島津製作所、型式: UV-120-02) により 660 nm の吸光度を測定し、試験菌液の増殖を確認した。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 2 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: DZA23901、2001年3月9日製造) を用いた。なお、培地 1L あたりの組成は下記のとおりで、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・7水和物	0.2 g
クエン酸・1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(株))	15 g

##### 2) トップアガー

下記の水溶液 (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) S9 mix

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

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 $\mu\text{mol}$
塩化カリウム	33 $\mu\text{mol}$
グルコース-6-リン酸	5 $\mu\text{mol}$
NADH	4 $\mu\text{mol}$
NADPH	4 $\mu\text{mol}$
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$

\* : 7 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール (PB) および 5,6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与で酵素誘導して作製した S9 (キッコーマン株、ロット番号 : RAA-445、2001 年 5 月 25 日製造) を購入し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存し、用時に解凍して用いた。

### 5. 被験物質調製液の調製

被験物質は、50 mg/mL の濃度で水より DMSO 中で良好な懸濁性が得られることから、試験に際しては、DMSO (和光純薬工業株、ロット番号 : SEG4422) に懸濁して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して、速やかに試験に用いた。調製時に、発熱、発泡、変色等の変化はみられなかった。

### 6. 試験操作

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加条件および S9 mix 添加条件で試験を行った。

小試験管中に被験物質調製液 0.1 mL、0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) または S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 20 分間プレインキュベーションした後、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  $37^{\circ}\text{C}$  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。被験物質に由来する沈澱の有無は、肉眼により観察した。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。

なお、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。

上記の方法により、用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、結果の再現性を確認した。

## 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もの（陽性）と判定することとした。

## [結果および考察]

### 1. 用量設定試験

上記のガイドラインに従って、50.0~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の範囲で公比を約 3 とし、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 無添加条件および S9 mix 添加条件ともに、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。また、被験物質に由来する沈澱は、S9 mix 無添加条件ではすべての用量で、S9 mix 添加条件では 150  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量で認められた。

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  $\mu\text{g}/\text{plate}$  とした。

### 2. 本試験

最高用量を 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  とし、公比 2 で 5 用量 (313~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) を設定して 2 回の本試験を行った (Table 2,3, Figure 1,2)。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。

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、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データ (Appendix 3) 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、2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールについては、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結果が得られている<sup>4)</sup>。また関連物質であるブチレーテイドヒドロキシトルエン<sup>5)</sup>については復帰突然変異試験および染色体異常試験で陰性の結果が、*p-tert*-ブチルフェノール<sup>6)</sup>、2-*tert*-ブチルフェノール<sup>7)</sup> および 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール<sup>8)</sup> については、復帰突然変異試験で陰性の、染色体異常試験で陽性の結果が報告されている。

以上の結果に基づき、2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールは、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) 田中 憲穂他：「2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験」,  
食薬セ研第12-1902号
- 5) 祖父尼俊雄 監修：染色体異常試験データ集改定1998年版, エル・アイ・シー, 東京, p. 92 (1999)
- 6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修：化学物質毒性試験報告, vol. 4, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p. 277 (1996)
- 7) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 監修：化学物質毒性試験報告, vol. 8, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p. 201 (2001)
- 8) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 監修：化学物質毒性試験報告, vol. 8, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p. 363 (2001)

Table 1. Cytotoxicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	115	123	106	13	16	8	28	34	26	18	19	14	7	12	10
		( 115 $\pm$ 9 )			( 12 $\pm$ 4 )			( 29 $\pm$ 4 )			( 17 $\pm$ 3 )			( 10 $\pm$ 3 )		
	50.0 †	117			8			25			12			9		
	150 †	147			12			27			13			6		
	500 †	125			8			26			16			7		
	1500 †	122			5			26			21			9		
	5000 †	136			12			20			15			11		
S9 mix (+)	0	134	138	125	12	20	15	41	42	30	33	28	26	17	16	21
		( 132 $\pm$ 7 )			( 16 $\pm$ 4 )			( 38 $\pm$ 7 )			( 29 $\pm$ 4 )			( 18 $\pm$ 3 )		
	50.0	135			13			47			26			13		
	150 †	103			10			31			34			16		
	500 †	128			18			40			23			9		
	1500 †	125			12			36			33			10		
	5000 †	127			9			25			23			10		
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	464	495	413	568	554	570	216	209	232	500	588	552	225	229	448
		( 457 $\pm$ 41 )			( 564 $\pm$ 9 )			( 219 $\pm$ 12 )			( 547 $\pm$ 44 )			( 301 $\pm$ 128 )		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	749	792	806	306	359	429	828	766	796	514	488	522	253	272	279
		( 782 $\pm$ 30 )			( 365 $\pm$ 62 )			( 797 $\pm$ 31 )			( 508 $\pm$ 18 )			( 268 $\pm$ 13 )		

The purity of the test substance was 100 wt% (LC area %).

This substance contained 0.01% water 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 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	131	123	127	8	12	9	19	23	23	21	26	23	15	12	15
		( 127 $\pm$ 4 )			( 10 $\pm$ 2 )			( 22 $\pm$ 2 )			( 23 $\pm$ 3 )			( 14 $\pm$ 2 )		
	313 †	107	105	134	4	12	8	19	19	37	26	15	28	13	6	8
		( 115 $\pm$ 16 )			( 8 $\pm$ 4 )			( 25 $\pm$ 10 )			( 23 $\pm$ 7 )			( 9 $\pm$ 4 )		
	625 †	134	116	104	8	9	10	18	15	13	13	14	20	7	10	6
		( 118 $\pm$ 15 )			( 9 $\pm$ 1 )			( 15 $\pm$ 3 )			( 16 $\pm$ 4 )			( 8 $\pm$ 2 )		
	1250 †	123	109	128	5	8	7	16	34	18	20	26	25	8	12	8
	( 120 $\pm$ 10 )			( 7 $\pm$ 2 )			( 23 $\pm$ 10 )			( 24 $\pm$ 3 )			( 9 $\pm$ 2 )			
2500 †	114	141	137	6	8	11	24	17	17	19	15	14	7	11	15	
	( 131 $\pm$ 15 )			( 8 $\pm$ 3 )			( 19 $\pm$ 4 )			( 16 $\pm$ 3 )			( 11 $\pm$ 4 )			
5000 †	128	118	136	11	14	9	13	23	29	23	21	17	8	7	8	
	( 127 $\pm$ 9 )			( 11 $\pm$ 3 )			( 22 $\pm$ 8 )			( 20 $\pm$ 3 )			( 8 $\pm$ 1 )			
S9 mix (+)	0	122	112	117	12	7	12	37	38	28	17	24	33	15	13	9
		( 117 $\pm$ 5 )			( 10 $\pm$ 3 )			( 34 $\pm$ 6 )			( 25 $\pm$ 8 )			( 12 $\pm$ 3 )		
	313 †	101	87	111	8	9	7	20	27	27	28	15	24	8	19	13
		( 100 $\pm$ 12 )			( 8 $\pm$ 1 )			( 25 $\pm$ 4 )			( 22 $\pm$ 7 )			( 13 $\pm$ 6 )		
	625 †	102	119	148	11	6	10	27	26	30	19	29	22	8	8	9
		( 123 $\pm$ 23 )			( 9 $\pm$ 3 )			( 28 $\pm$ 2 )			( 23 $\pm$ 5 )			( 8 $\pm$ 1 )		
	1250 †	117	96	107	10	5	5	22	25	30	22	24	26	6	12	10
	( 107 $\pm$ 11 )			( 7 $\pm$ 3 )			( 26 $\pm$ 4 )			( 24 $\pm$ 2 )			( 9 $\pm$ 3 )			
2500 †	148	132	131	7	16	11	20	22	23	35	24	26	17	10	10	
	( 137 $\pm$ 10 )			( 11 $\pm$ 5 )			( 22 $\pm$ 2 )			( 28 $\pm$ 6 )			( 12 $\pm$ 4 )			
5000 †	139	126	135	11	8	6	29	21	28	26	24	22	12	5	8	
	( 133 $\pm$ 7 )			( 8 $\pm$ 3 )			( 26 $\pm$ 4 )			( 24 $\pm$ 2 )			( 8 $\pm$ 4 )			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	477	501	402	525	546	536	196	209	183	404	417	366	482	343	324
		( 460 $\pm$ 52 )			( 536 $\pm$ 11 )			( 196 $\pm$ 13 )			( 396 $\pm$ 27 )			( 383 $\pm$ 86 )		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	770	783	754	391	377	332	938	785	908	487	473	534	258	289	280
		( 769 $\pm$ 15 )			( 367 $\pm$ 31 )			( 877 $\pm$ 81 )			( 498 $\pm$ 32 )			( 276 $\pm$ 16 )		

The purity of the test substance was 100 wt% (LC area %).

This substance contained 0.01% water 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 3. Mutagenicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	111	125	112	6	11	11	22	29	26	20	21	16	11	11	9
		( 116 $\pm$ 8 )	( 9 $\pm$ 3 )	( 26 $\pm$ 4 )	( 19 $\pm$ 3 )	( 10 $\pm$ 1 )										
	313 †	133	113	145	12	8	9	27	28	29	22	15	13	9	5	6
		( 130 $\pm$ 16 )	( 10 $\pm$ 2 )	( 28 $\pm$ 1 )	( 17 $\pm$ 5 )	( 7 $\pm$ 2 )										
	625 †	135	127	119	15	16	10	24	24	18	19	19	16	15	10	3
		( 127 $\pm$ 8 )	( 14 $\pm$ 3 )	( 22 $\pm$ 3 )	( 18 $\pm$ 2 )	( 9 $\pm$ 6 )										
	1250 †	146	149	132	11	12	9	19	23	22	13	21	10	19	6	8
	( 142 $\pm$ 9 )	( 11 $\pm$ 2 )	( 21 $\pm$ 2 )	( 15 $\pm$ 6 )	( 11 $\pm$ 7 )											
2500 †	137	126	136	5	8	16	28	20	30	15	15	13	5	5	6	
	( 133 $\pm$ 6 )	( 10 $\pm$ 6 )	( 26 $\pm$ 5 )	( 14 $\pm$ 1 )	( 5 $\pm$ 1 )											
5000 †	125	142	146	5	12	10	30	27	17	12	16	14	8	8	7	
	( 138 $\pm$ 11 )	( 9 $\pm$ 4 )	( 25 $\pm$ 7 )	( 14 $\pm$ 2 )	( 8 $\pm$ 1 )											
S9 mix (+)	0	129	136	116	10	6	13	29	24	29	26	22	21	15	6	17
		( 127 $\pm$ 10 )	( 10 $\pm$ 4 )	( 27 $\pm$ 3 )	( 23 $\pm$ 3 )	( 13 $\pm$ 6 )										
	313 †	101	125	122	9	14	13	12	27	28	14	18	20	10	6	7
		( 116 $\pm$ 13 )	( 12 $\pm$ 3 )	( 22 $\pm$ 9 )	( 17 $\pm$ 3 )	( 8 $\pm$ 2 )										
	625 †	118	126	123	13	9	9	35	20	20	20	23	20	10	5	6
		( 122 $\pm$ 4 )	( 10 $\pm$ 2 )	( 25 $\pm$ 9 )	( 21 $\pm$ 2 )	( 7 $\pm$ 3 )										
1250 †	128	150	113	12	11	12	32	29	23	18	21	12	6	14	9	
	( 130 $\pm$ 19 )	( 12 $\pm$ 1 )	( 28 $\pm$ 5 )	( 17 $\pm$ 5 )	( 10 $\pm$ 4 )											
2500 †	126	126	133	14	8	9	29	19	26	13	21	18	12	9	12	
	( 128 $\pm$ 4 )	( 10 $\pm$ 3 )	( 25 $\pm$ 5 )	( 17 $\pm$ 4 )	( 11 $\pm$ 2 )											
5000 †	141	135	93	15	17	8	35	37	29	19	17	26	6	9	8	
	( 123 $\pm$ 26 )	( 13 $\pm$ 5 )	( 34 $\pm$ 4 )	( 21 $\pm$ 5 )	( 8 $\pm$ 2 )											
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	663	671	621	619	482	540	266	277	259	499	498	429	345	445	294
		( 652 $\pm$ 27 )	( 547 $\pm$ 69 )	( 267 $\pm$ 9 )	( 475 $\pm$ 40 )	( 361 $\pm$ 77 )										
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	856	765	842	359	368	275	781	848	841	372	451	434	245	339	329
		( 821 $\pm$ 49 )	( 334 $\pm$ 51 )	( 823 $\pm$ 37 )	( 419 $\pm$ 42 )	( 304 $\pm$ 52 )										

The purity of the test substance was 100 wt% (LC area %).

This substance contained 0.01% water 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.

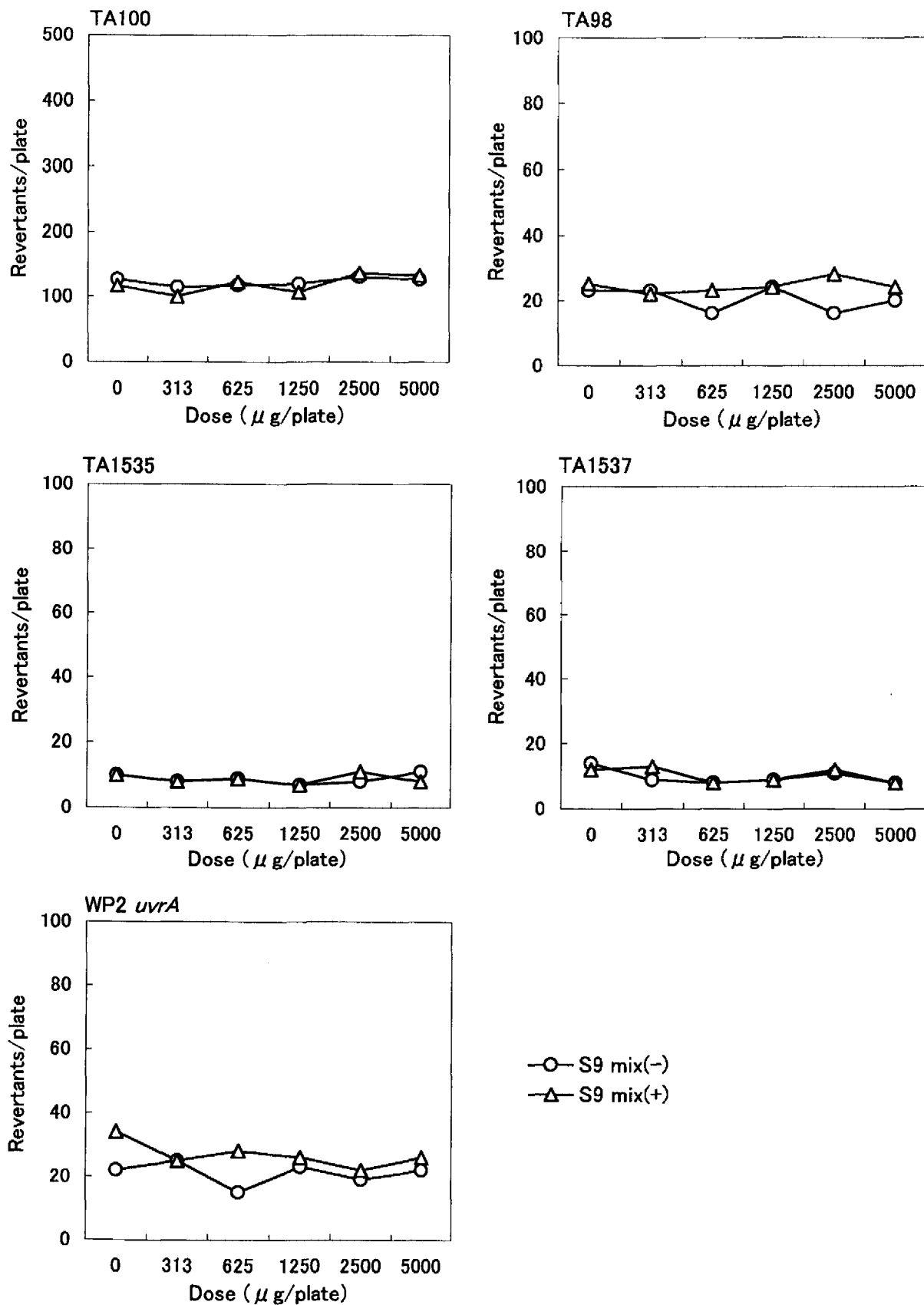


Figure 1. Dose response curves of mutagenicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in bacteria (I)

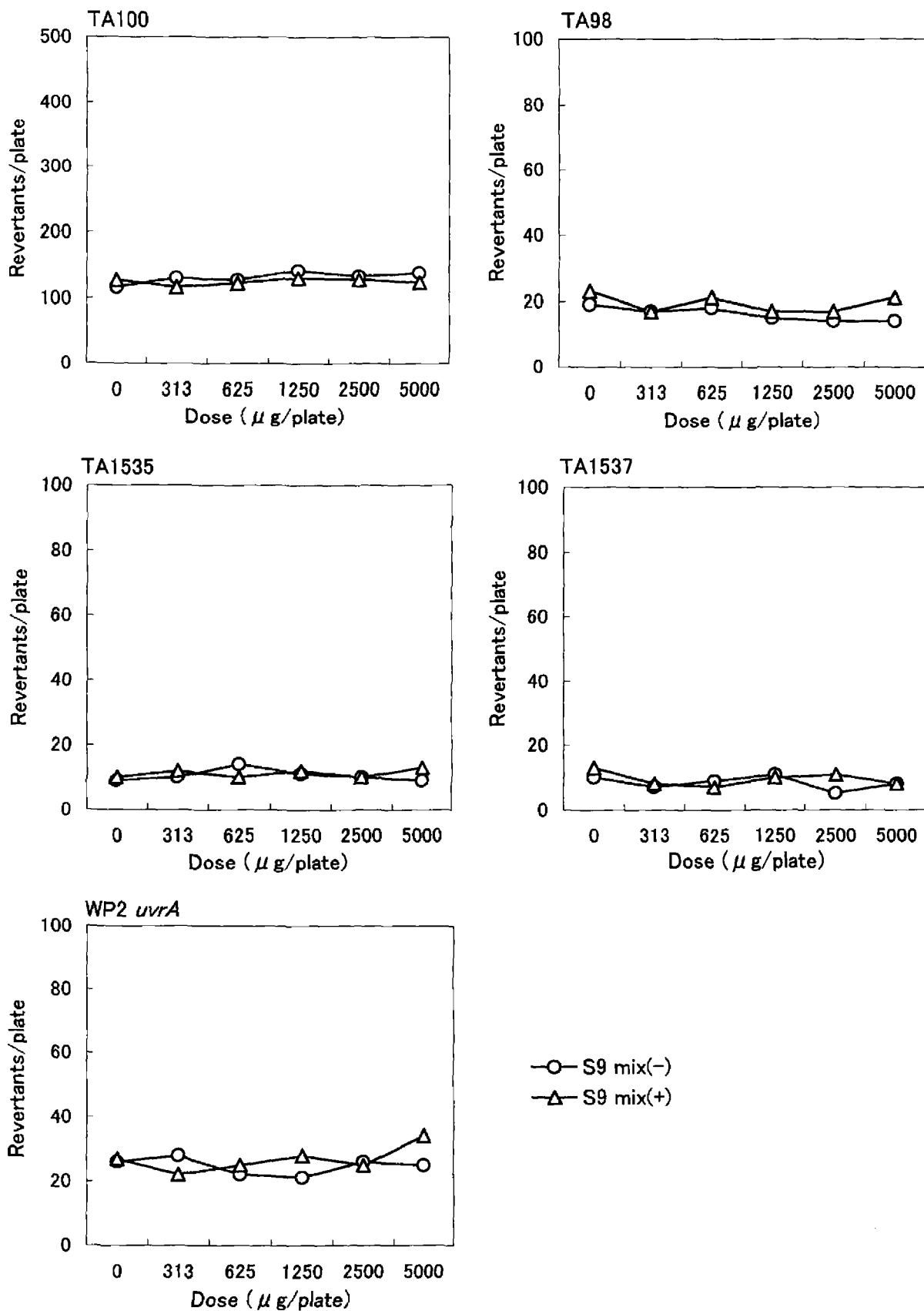


Figure 2. Dose response curves of mutagenicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole in bacteria (II)