

最終報告書

4-(1-Methylethenyl)-phenol の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : 5458 (115-148)

平成 14 年 3 月 4 日

試験委託者
厚生労働省 医薬局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約	3
12. 被験物質	7
13. 試験材料および方法	9
14. 試験結果	16
15. 考察および結論	18
16. 参考文献	19

Figures	F-01~12
Figure 1 Dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA100	F-01
Figure 2 Dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA1535	F-02
Figure 3 Dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain WP2 <i>uvrA</i>	F-03
Figure 4 Dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA98	F-04
Figure 5 Dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA1537	F-05
Figure 6 Bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA100	F-06

Figure 7	Bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA1535	F-07
Figure 8	Bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain WP2 <i>uvrA</i>	F-08
Figure 9	Bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA98	F-09
Figure 10	Bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA1537	F-10
Figure 11	Bacterial reversion test (restudy) of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA100	F-11
Figure 12	Bacterial reversion test (restudy) of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain WP2 <i>uvrA</i>	F-12
Tables		T-1~5
Table 1	Summary data of dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol [non-activation method : -S9]	T-1
Table 2	Summary data of dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol [activation method : +S9]	T-2
Table 3	Results of the bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol [non-activation method : -S9]	T-3
Table 4	Results of the bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol [activation method : +S9]	T-4
Table 5	Results of the bacterial reversion test (restudy) of 4-(1-Methylethenyl)- phenol [non-activation method : -S9]	T-5

1. 要約

本試験条件下において、4-(1-Methylethenyl)-phenol 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。

4-(1-Methylethenyl)-phenol 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。

その結果、4-(1-Methylethenyl)-phenol 処理では 2.29~5000 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、陰性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、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

4-(1-Methylethenyl)-phenol

12.2. ロット番号

12.3. 純度/含量

99 wt%以上

12.4. 不純物の名称および純度

知見なし

12.5. 提供元

12.6. 保存条件

直射日光を避け、火気・熱源から遠ざけて保管した。
室温では2量化するのので、冷凍保存した。

12.7. 保管場所

安評センター被験物質保存庫 (C-2)

12.8. 一般名

ミレックス PM, *p*-イソプロペニルフェノール

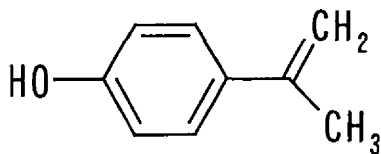
12.9. 化学名

Phenol, 4-(1-methylethenyl)-

12.10. CAS No.

4286-23-1

12.11. 化学構造



12.12. 分子式

 $C_9H_{10}O$

- 12.13. 分子量
134.18
- 12.14. 物質の状態
白～淡黄色粉体
- 12.15. 沸点
知見なし
- 12.16. 融点
80～83°C
- 12.17. 溶解性
水に難溶，アセトンおよびメタノールに可溶．DMSO に易溶．
- 12.18. 蒸気圧
3333 Pa (142°C)
- 12.19. 取り扱い上の注意
火気厳禁
吸入，皮膚への接触を防ぎ，目に入らぬよう適切な保護具を着用した．
- 12.20. 残余被験物質の処理
被験物質の一部を保管した後，残余は，被験物質提供元に返却した．

13. 試験材料および方法

13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

- 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日にカリフォルニア大学()から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。

平成12年10月27日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO:GC用;Merck KGaA;純度99.7%以上, Lot No. K27073678 947)を容量比80:7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー(MDF-U71V:三洋電機メディカシステム株式会社)に保存(-80°C)した。

13.2. 培地の調製

13.2.1. 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(オリエンタル酵母工業株式会社:平成13年6月28日製造, Lot No. ANI410FQ)を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地Eを含む組成の溶液30 mLを無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した.

硫酸マグネシウム・7水塩	0.2	g
クエン酸・1水塩	2	g
リン酸二カリウム・無水塩	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
寒天 (伊那寒天 BA-30A ; Lot No. 00221)	15	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー (軟寒天)

塩化ナトリウム 0.5 w/v% および寒天 (Bacto-agar: Difco Laboratories; Lot No. 136958JC) 0.6 w/v% を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した後, ネズミチフス菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-ヒスチジン (関東化学株式会社; Lot No. 107D2017) および 0.5 mmol/L D-ピオチン (関東化学株式会社; Lot No. 811S2086) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え, 大腸菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-トリプトファン (関東化学株式会社; Lot No. 608E1385) 水溶液を同じく 1 容量加えた.

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバッフル付三角フラスコに 2.5 w/v% ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2: Oxoid Limited; Lot No. 219916) 培養液を 25 mL 分注し, これに融解した菌懸濁液を 50 μ L 接種した. 培養開始までの間冷却ユニット (ECS-1: 東京理化学器械株式会社) を用いて 4°C 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) を用い, 37°C で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した. 試験毎に菌株の培養を実施し, 菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した.

ATP フォトメーター (ルミテスター K-100: キッコーマン株式会社) を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試験	試験生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	3.63	2.97	3.39	3.15	1.63
復帰突然変異試験	2.35	2.27	2.73	4.10	1.07
再試験	3.09	—	3.92	—	—

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (キッコーマン株式会社; Lot No. FSM-447) を試験に使用した。

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法を以下に示した。

ロット番号	RAA-447
製造年月日	平成 13 年 6 月 29 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	211~241 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF)
投与量および投与回数	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)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	26.79 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

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

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に易溶であり、かつ同溶液中で安定であるため、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (Merck KGaA ; Lot No. K26414578 013) に溶解し、調製原液とした。この調製原液を使用溶媒を用いて順次希釈した後、速やかに処理を行った。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒で試験した。

13.6.2. 陽性対照

陽性対照として以下の物質を使用した。各陽性対照物質は DMSO (Lot No. K26414578 013) を用いて溶解し、小分けした後凍結保存 (-20°C) したものを試験に使用した。

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 ; 純度 99.1% ; Lot No. PAE1151)
NaN ₃	アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社 ; 純度 99.8% ; Lot No. TPR1596)
9-AA	9-アミノアクリジン塩酸塩 (Aldrich Chemical Co., Inc. ; 純度 98.8% ; Lot No. 03024JR)
2-AA	2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社 ; 純度 96.6% ; Lot No. KSE1917)

《代謝活性化系非存在下：-S9 mix》

a.	AF-2	0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA100)
b.	AF-2	0.1 "	(ネズミチフス菌：TA98)
c.	NaN_3	0.5 "	(ネズミチフス菌：TA1535)
d.	9-AA	80 "	(ネズミチフス菌：TA1537)
e.	AF-2	0.01 "	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i>)

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

a.	2-AA	1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA100)
b.	2-AA	0.5 "	(ネズミチフス菌：TA98)
c.	2-AA	2 "	(ネズミチフス菌：TA1535)
d.	2-AA	2 "	(ネズミチフス菌：TA1537)
e.	2-AA	10 "	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i>)

なお、これらの試験用量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」に準じて設定した。

13.6.3. 無菌試験

被験物質液（調製原液）ならびに S9 mix について無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100 μL あるいは S9 mix 500 μL にトップアガーをそれぞれ 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。

調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

4-(1-Methylethenyl)-phenol 調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

13.7. 用量設定試験 (予備試験)

13.7.1. 試験用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 μg /プレート を最高用量とし、以下 1667, 556, 185, 61.7, 20.6, 6.86 および 2.29 μg /プレートの 8 用量 (公比 3) を設定した。

13.7.2. 使用プレート数および識別

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

試験菌株の別、S9 mix の有無および試験用量を明記することにより各プレートを識別した。

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

試験管に使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μL 、次いで代謝活性化系非存在下 (-S9 mix) の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500 μL 、代謝活性化系存在下 (+S9 mix) の場合、S9 mix を 500 μL 分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 μL を加えた後、振盪恒温器 (M-100^N: タイテック株式会社) を用いて 37°C で 20 分間振盪 (プレインキュベーション) した。振盪終了後、トップアガーを 2 mL 添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器を用いて 37°C の条件で 48 時間各プレートを培養した。

13.7.4. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株 (背景菌) の生育状態について実体顕微鏡 ($\times 60$) を用いて観察した。さらに被験物質の析出状態を肉眼で観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計測した。計測に際しては、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) 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。

生育阻害により、コロニーアナライザーの使用が不適当な場合、目視で計数した。

13.8. 復帰突然変異試験

13.8.1. 試験用量

用量設定試験の結果，高用量で生育阻害作用が認められたため，生育阻害作用を指標に，本試験においては以下に示した用量を最高用量とし，それぞれ6~7用量（公比2）を設定した。

試験系	最高用量 (μg/プレート)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
代謝活性化系 非存在下	800	800	1600	800	800
代謝活性化系 存在下	800	800	1600	800	800

代謝活性化系非存在下の TA100 および WP2 *uvrA* において，陽性対照群のコロニー数が背景値から外れたため，同用量で再試験を実施した。

13.8.2. 使用プレート数および識別

13.7.2.に準じた。

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

13.7.3.に準じた。ただし，再試験において一部機器は振盪恒温器（MM-10：タイテック株式会社）を用いた。

13.8.4. コロニー数計測

13.7.4.に準じた。

13.9. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照の2倍以上の増加を示し，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。

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した.

4-(1-Methylethenyl)-phenol 処理での復帰突然変異コロニー数は, 各試験菌株のいずれの用量においても明確な増加傾向は認められなかった. 生育阻害作用は, 代謝活性化系非存在下のサルモネラ菌および代謝活性化系存在下の TA98 以外のサルモネラ菌では 556 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上, 大腸菌および代謝活性化系存在下の TA98 では 1667 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量において観察された.

一方, 陽性対照物質はそれぞれの菌株において, 陰性対照の 2 倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した.

14.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

コロニー計数時, 両試験法 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で白色粉末状の析出物が観察された.

14.3. 復帰突然変異試験

試験結果を Figure 6~10 および Table 3, 4 に示した.

被験物質処理群の場合, 代謝活性化系非存在下, 代謝活性化系存在下ともいずれの菌株においても復帰突然変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった. 各試験菌株のいずれの処理群においても, 試験菌株に対する生育阻害作用が高用量群で観察された.

一方, 陽性対照物質は各試験菌株に対し, 復帰突然変異を顕著に誘発した. ただし, 代謝活性化系非存在下の TA100 および WP2 *uvrA* において, 陽性対照群のコロニー数が背景値の上限から外れた.

14.4. 被験物質の析出等 (復帰突然変異試験)

コロニー計数時, 試験物質の析出は観察されなかった.

14.5. 復帰突然変異試験 (再試験)

試験結果を Figure 11, 12 および Table 5 に示した.

被験物質処理群の場合, 代謝活性化系非存在下の両菌株において復帰突然変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった. 両試験菌株のいずれの処理群においても, 試験菌株に対する生育阻害作用が高用量群で観察された.

一方, 陽性対照物質は両試験菌株に対し, 復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.6. 被験物質の析出等（再試験）

コロニー計数時、試験物質の析出は観察されなかった。

以上、用量設定試験、復帰突然変異試験および再試験において、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下の両試験系とも再現性が確認された。

15. 考察および結論

4-(1-Methylethenyl)-phenol 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 5000 μg /プレート の用量まで検討した。その結果，4-(1-Methylethenyl)-phenol 処理群では代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても，陰性対照と比較し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。

また，本被験物質 4-(1-Methylethenyl)-phenol の変異原性に関する報告はなかった。類縁体である 2, 4, 6-trichlorophenol は V79 培養細胞を用いた hprt 突然変異試験で陽性との報告があった¹⁾。しかしながら，類縁体である 4-alkylphenols の変異原性に関する報告はなかった。

なお，陰性対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数は，復帰突然変異試験の代謝活性化系非存在下の TA100 および WP2 *uvrA* 以外いずれも当施設での背景データ（Appendix 1）の範囲内であり，本試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から，本試験条件下において 4-(1-Methylethenyl)-phenol 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。

16. 参考文献

- 1) Jansson K., Jansson V. : Mutat. Res., 280 (3):175-179, (1992).

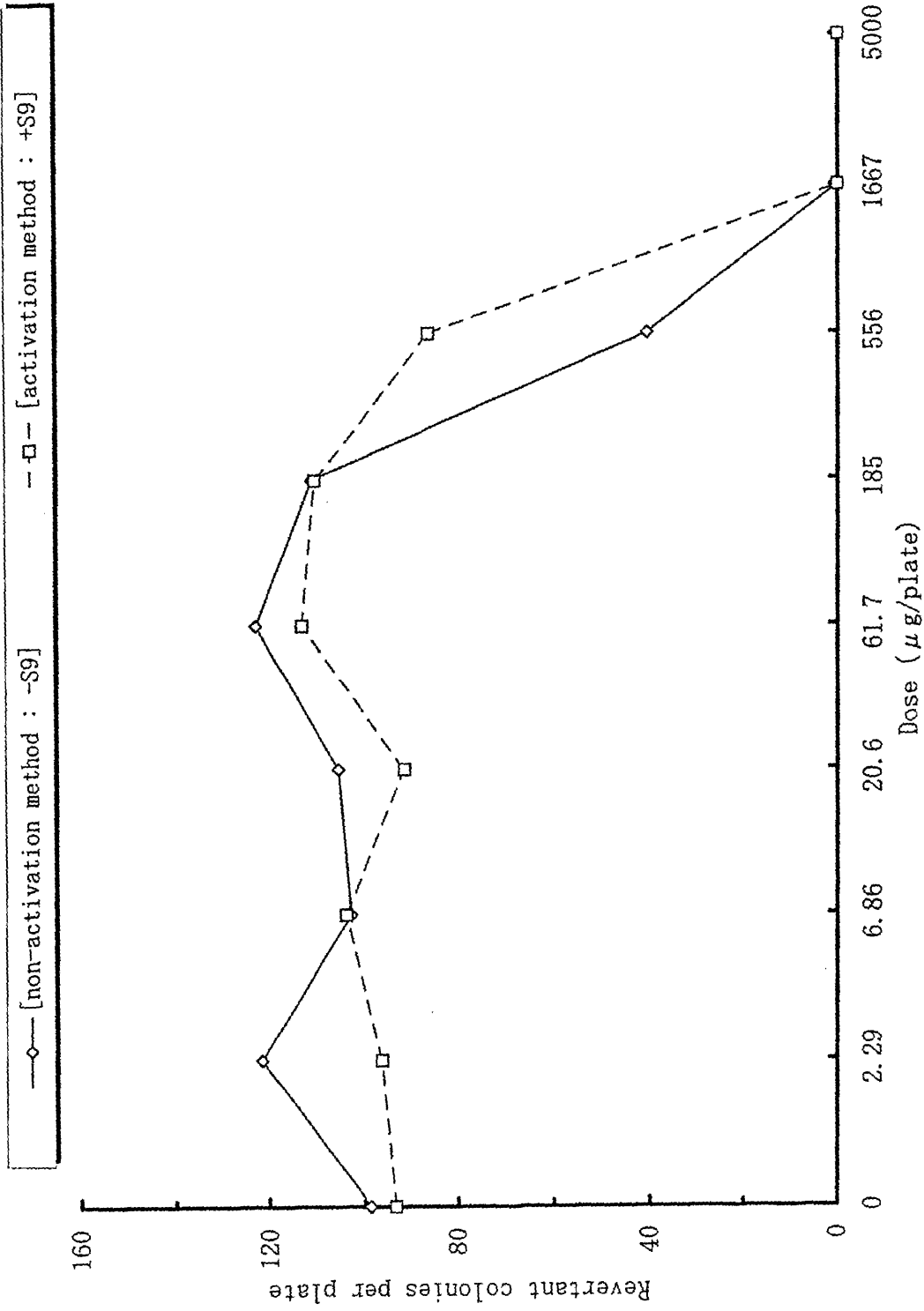


Figure 1. Dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA100

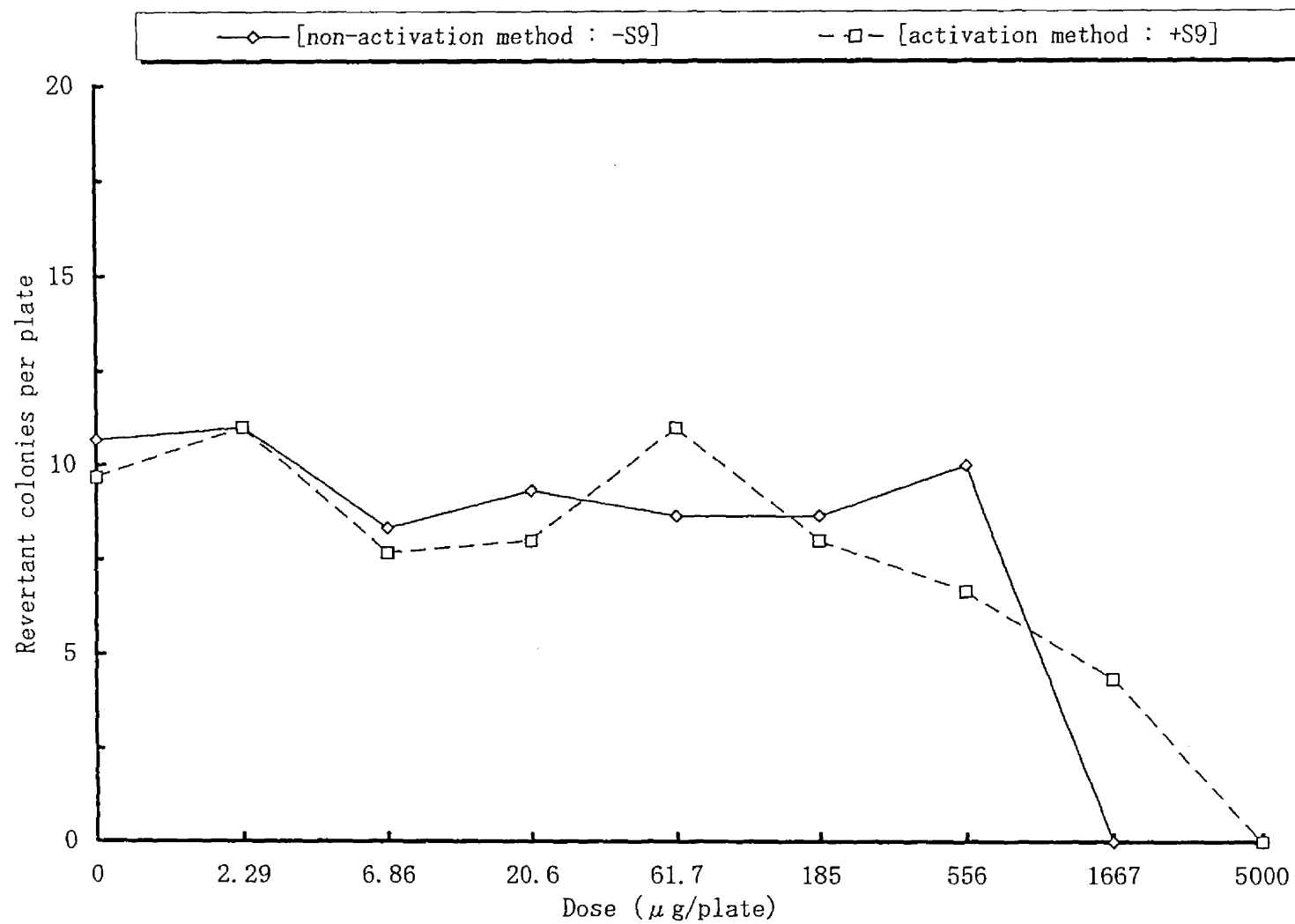


Figure 2. Dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA1535

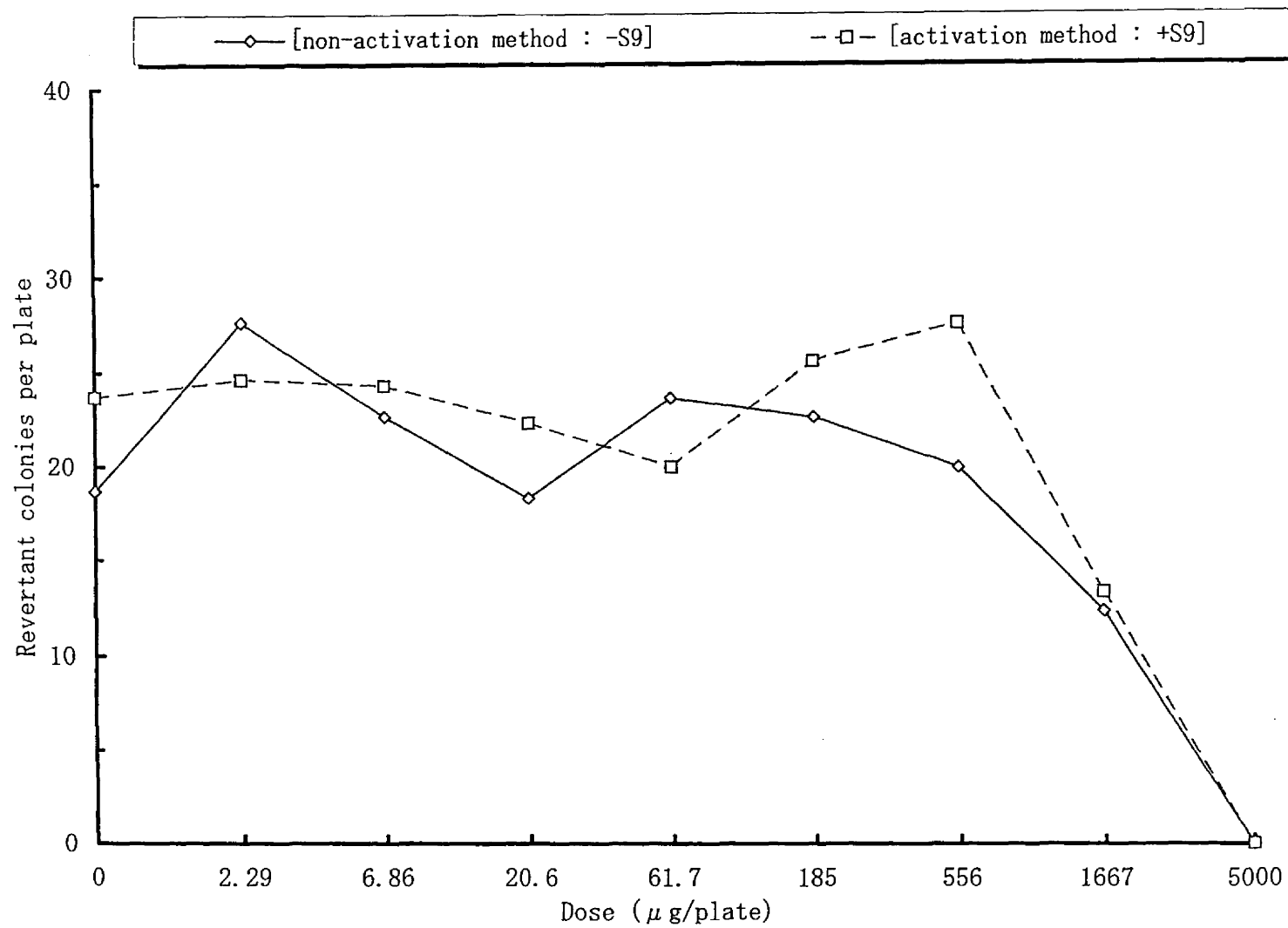


Figure 3. Dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain WP2uvrA

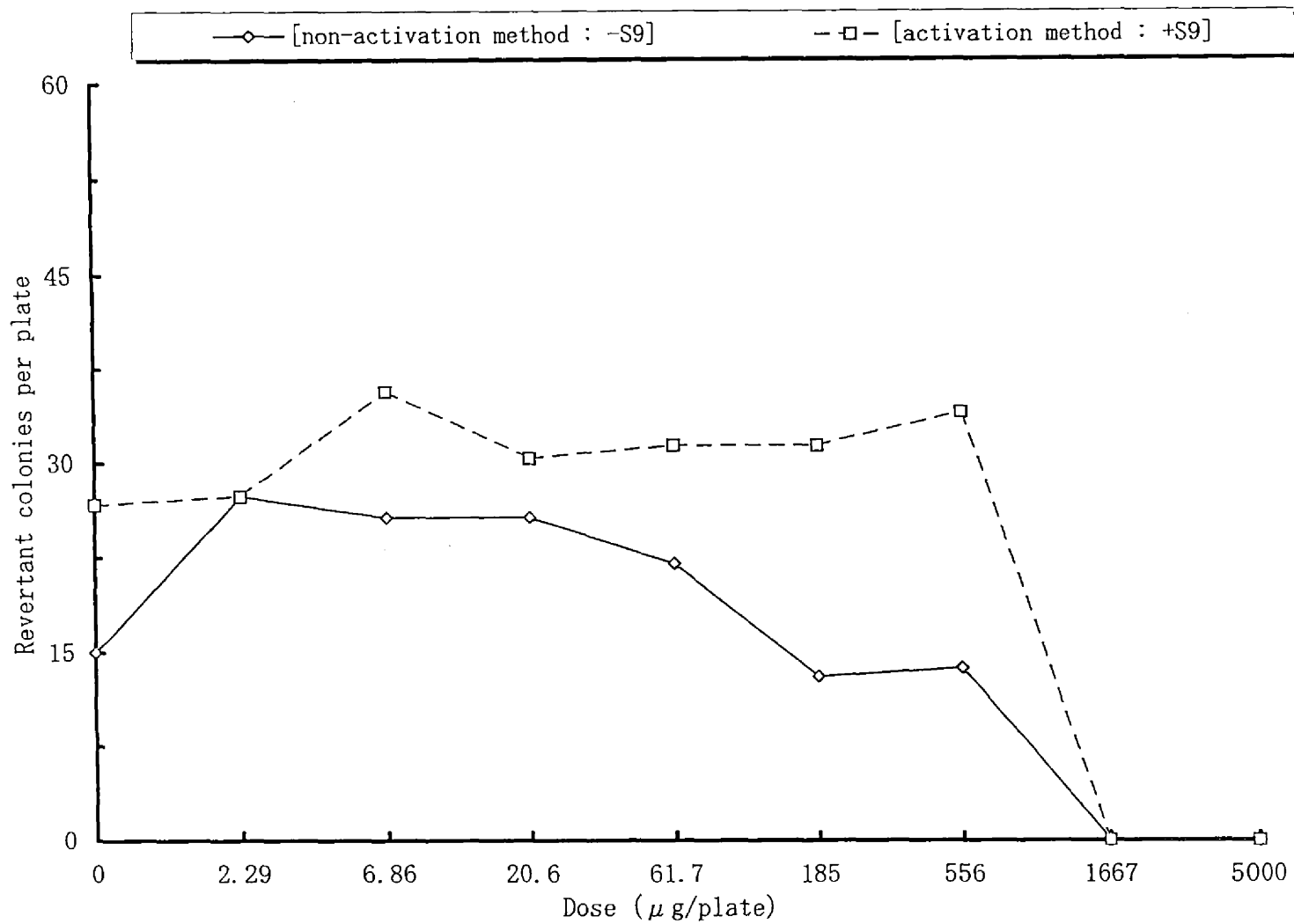


Figure 4. Dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA98

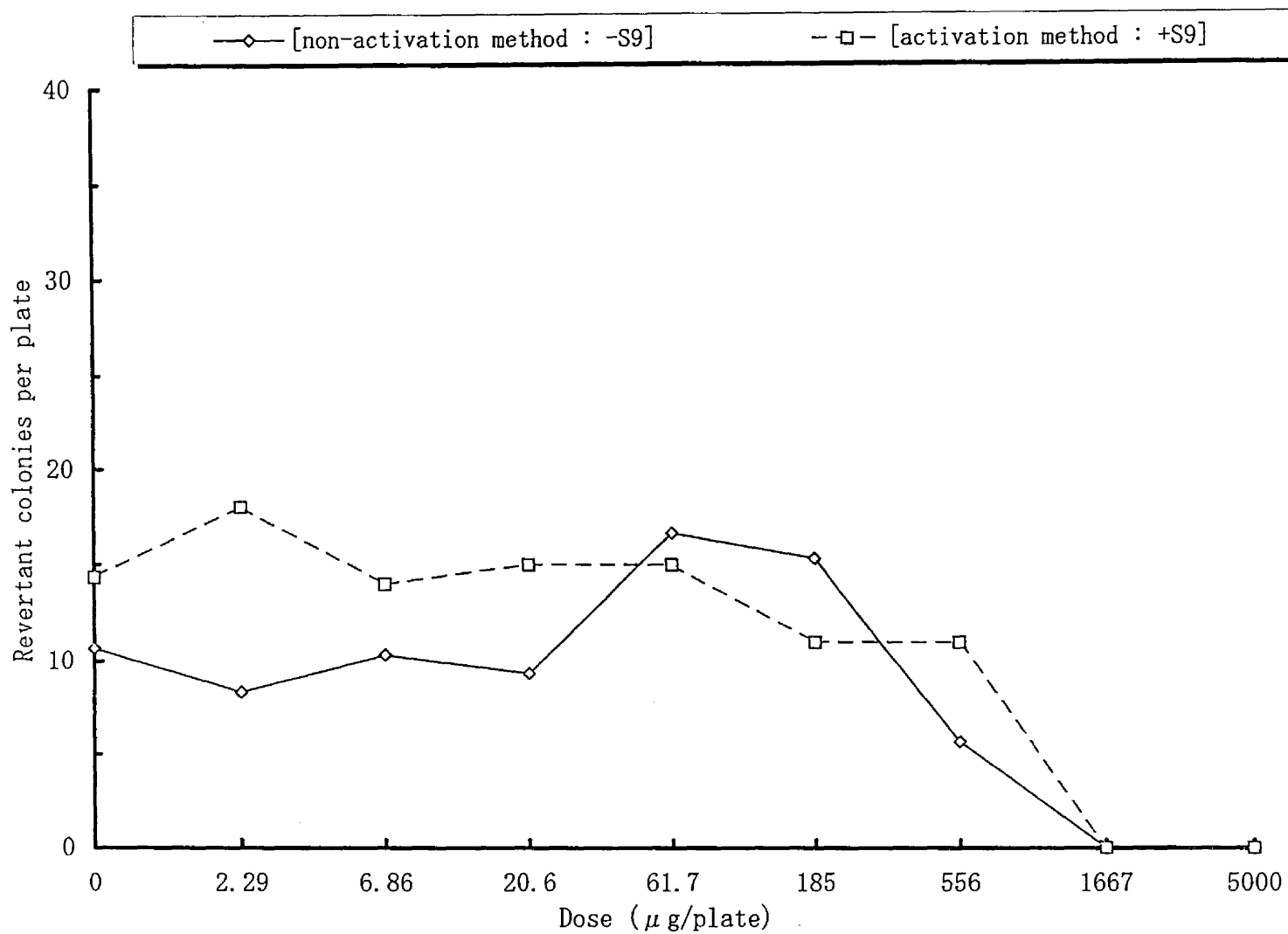


Figure 5. Dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA1537

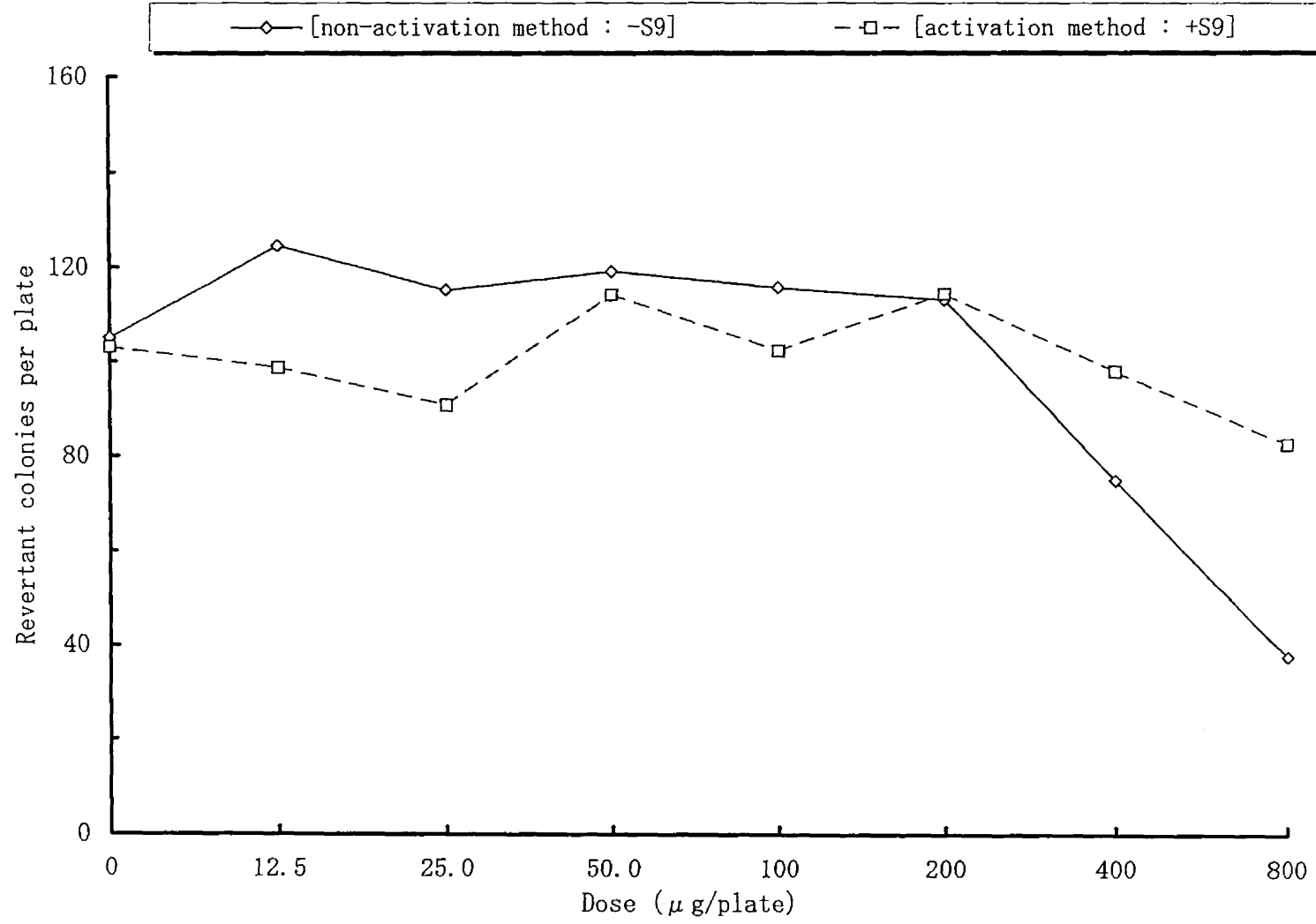


Figure 6. Bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA100

F-06

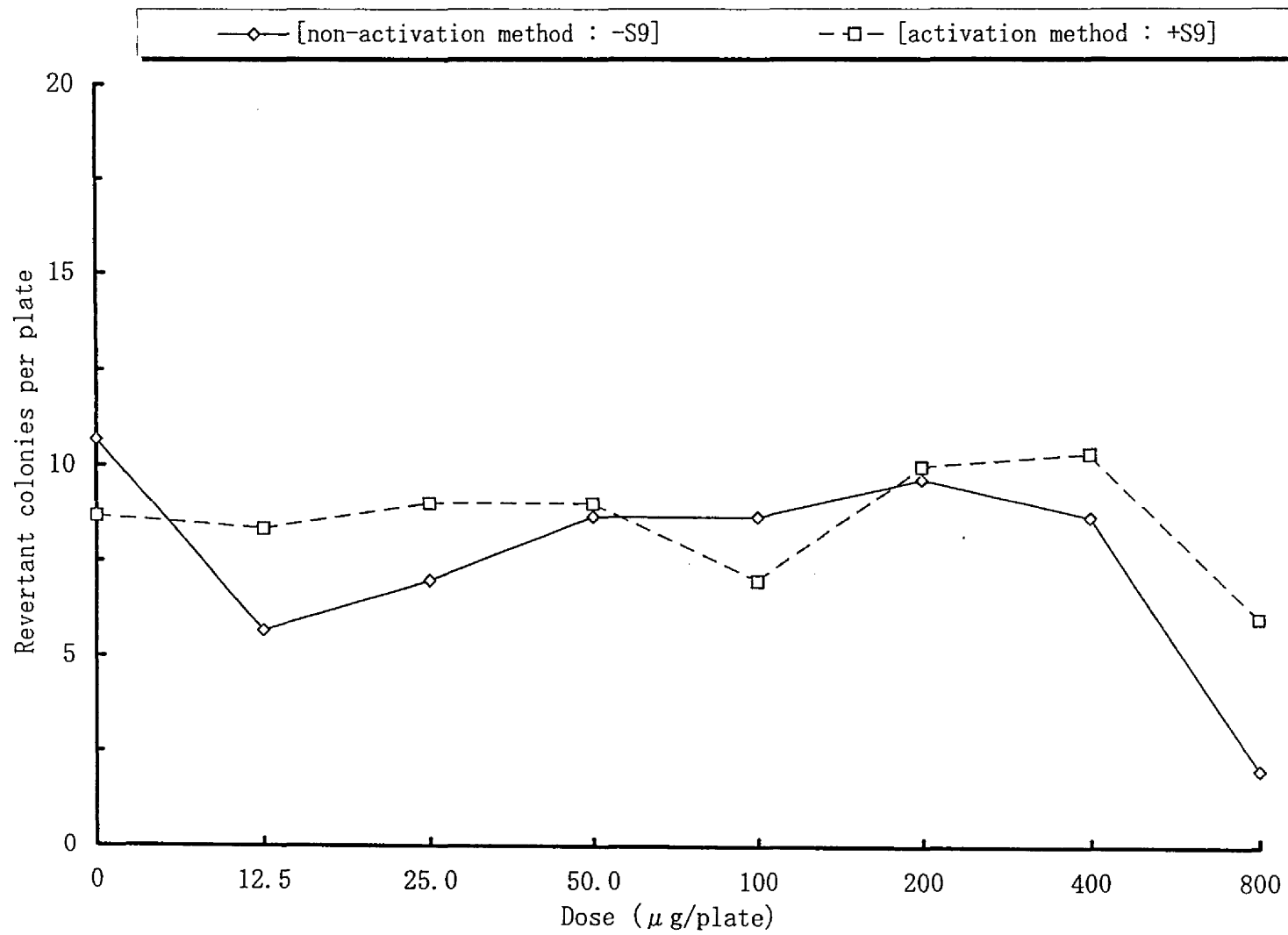


Figure 7. Bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA1535

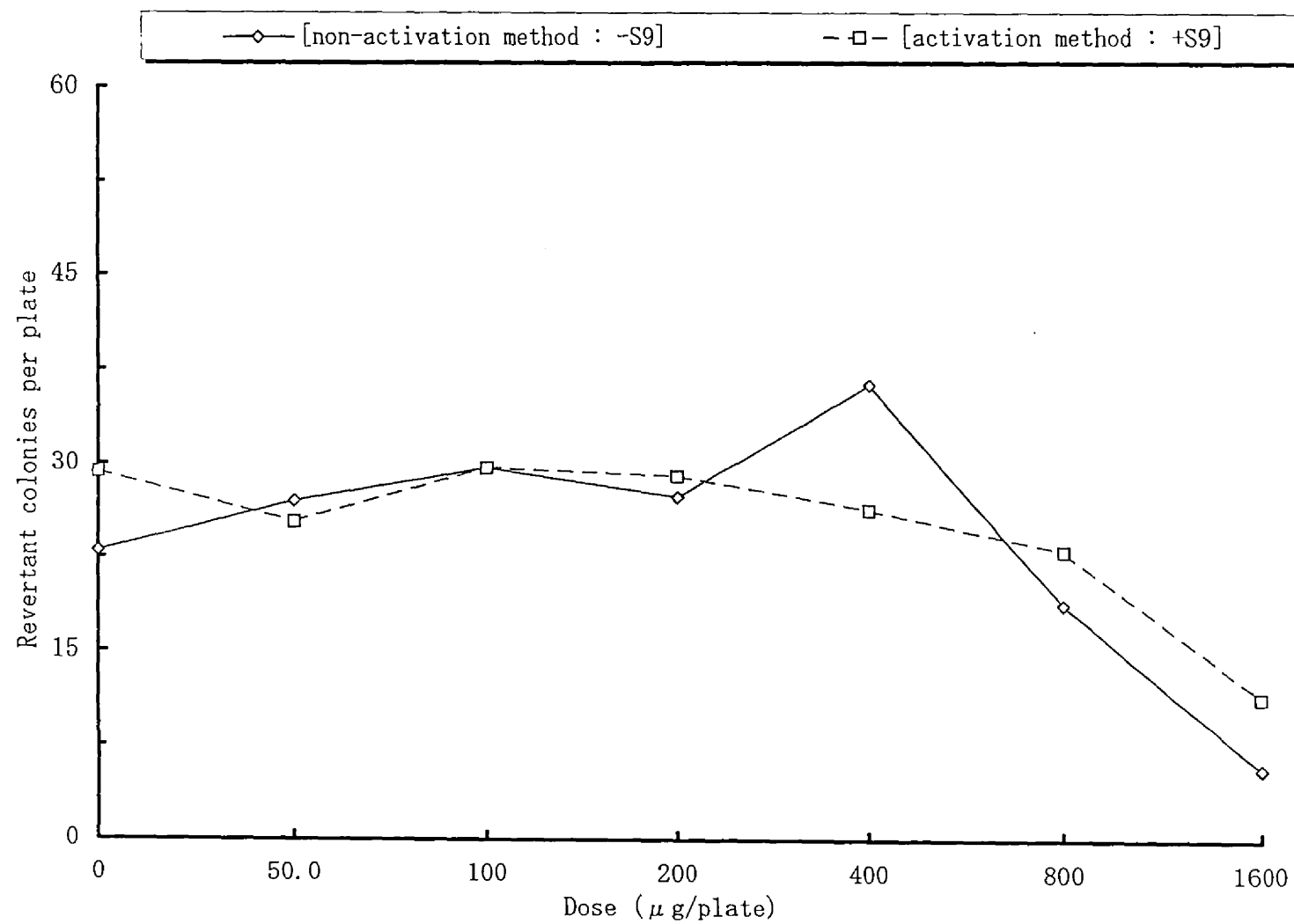


Figure 8. Bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain WP2uvrA

60-J

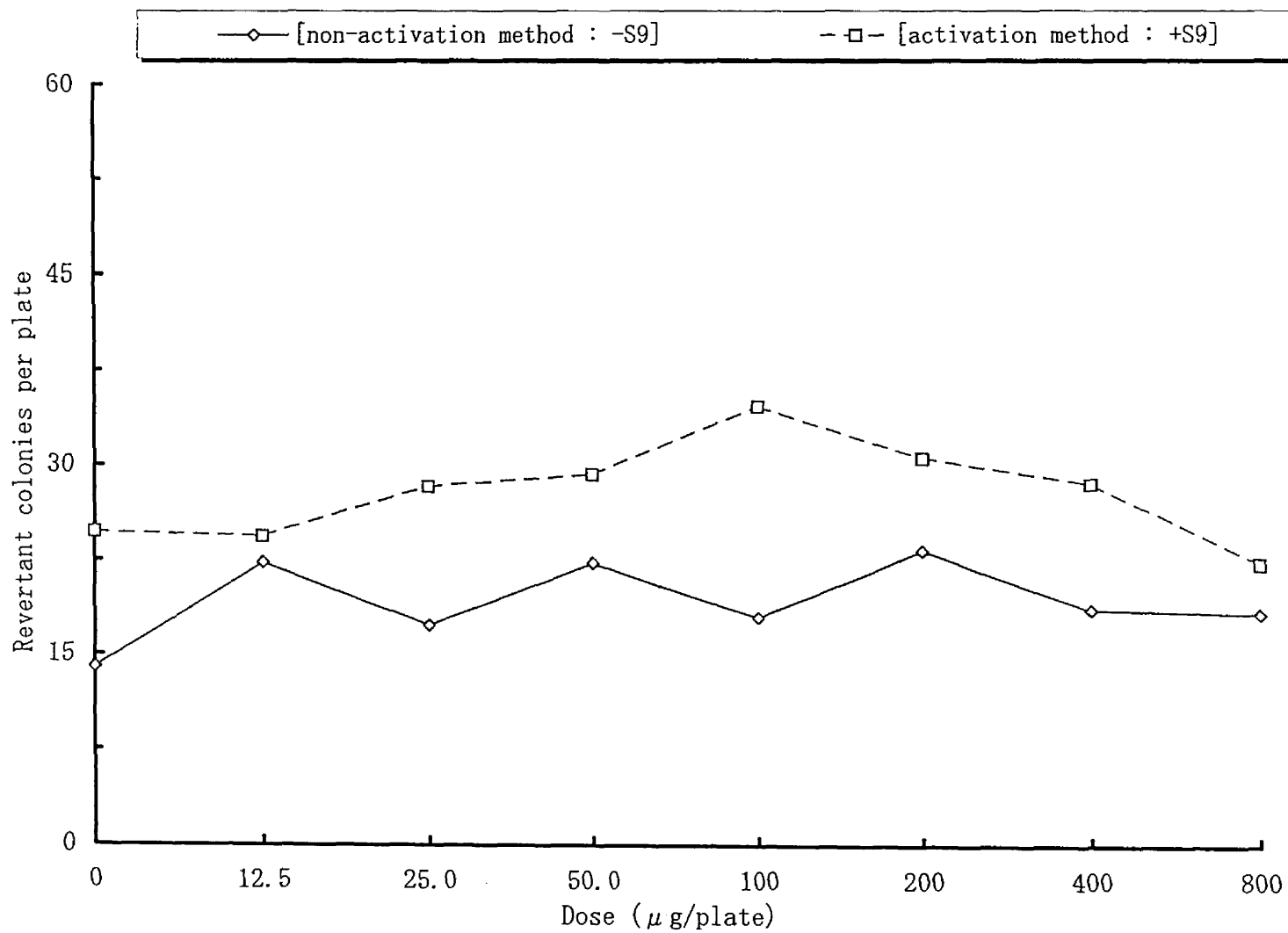


Figure 9. Bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA98

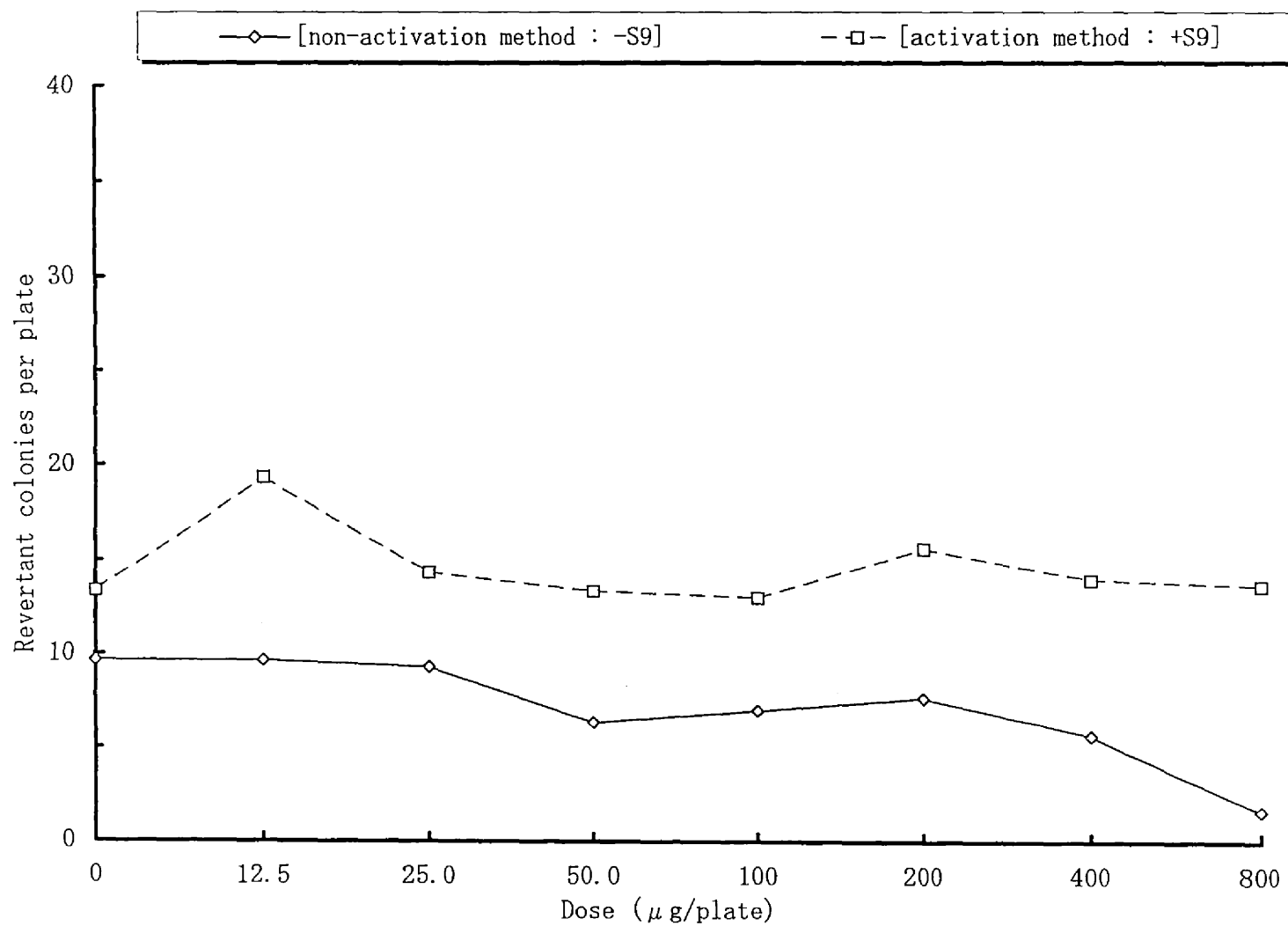


Figure 10. Bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol in strain TA1537

F-10

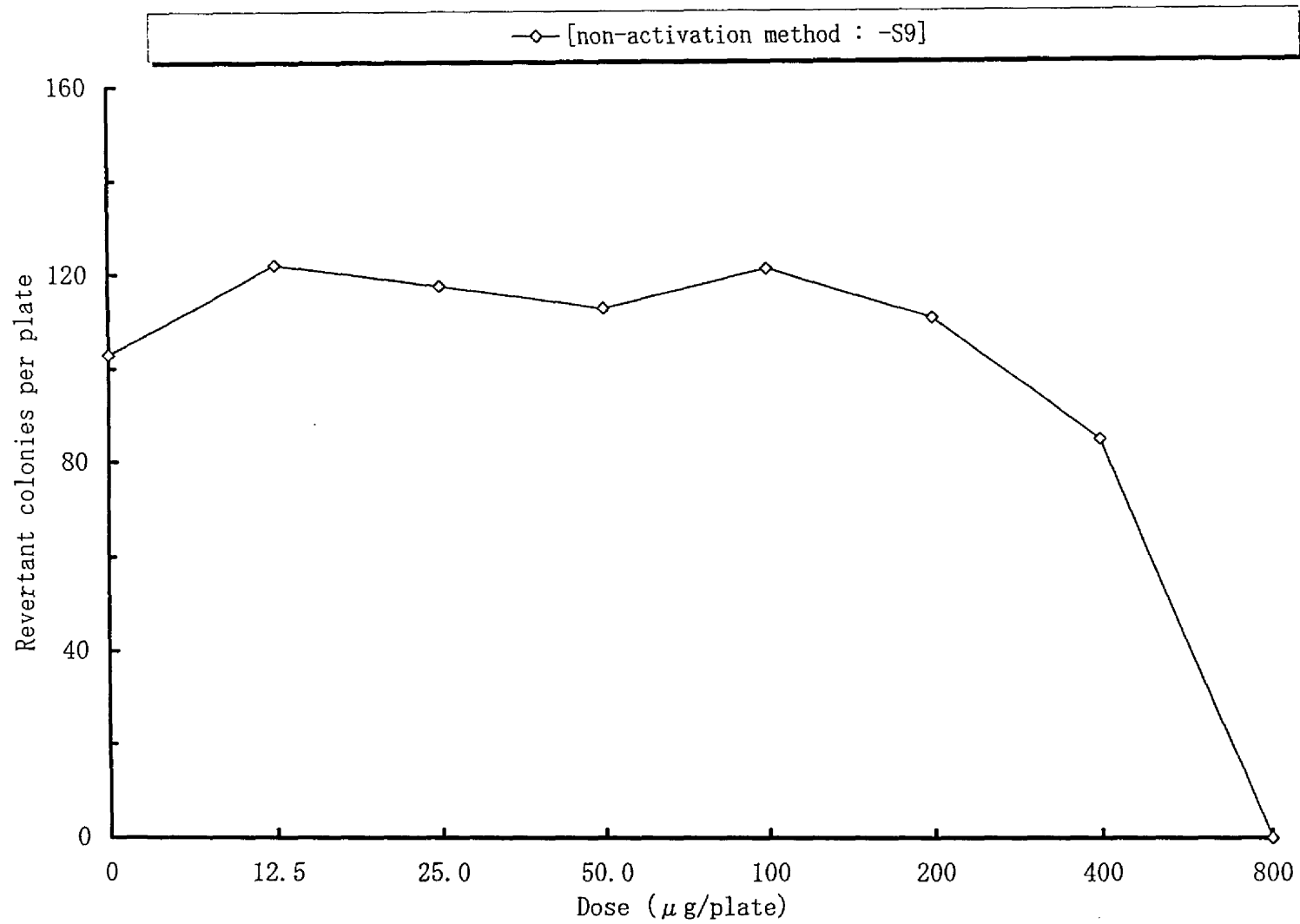


Figure 11. Bacterial reversion test (restudy) of 4-(1-methylethenyl)-phenol in strain TA100

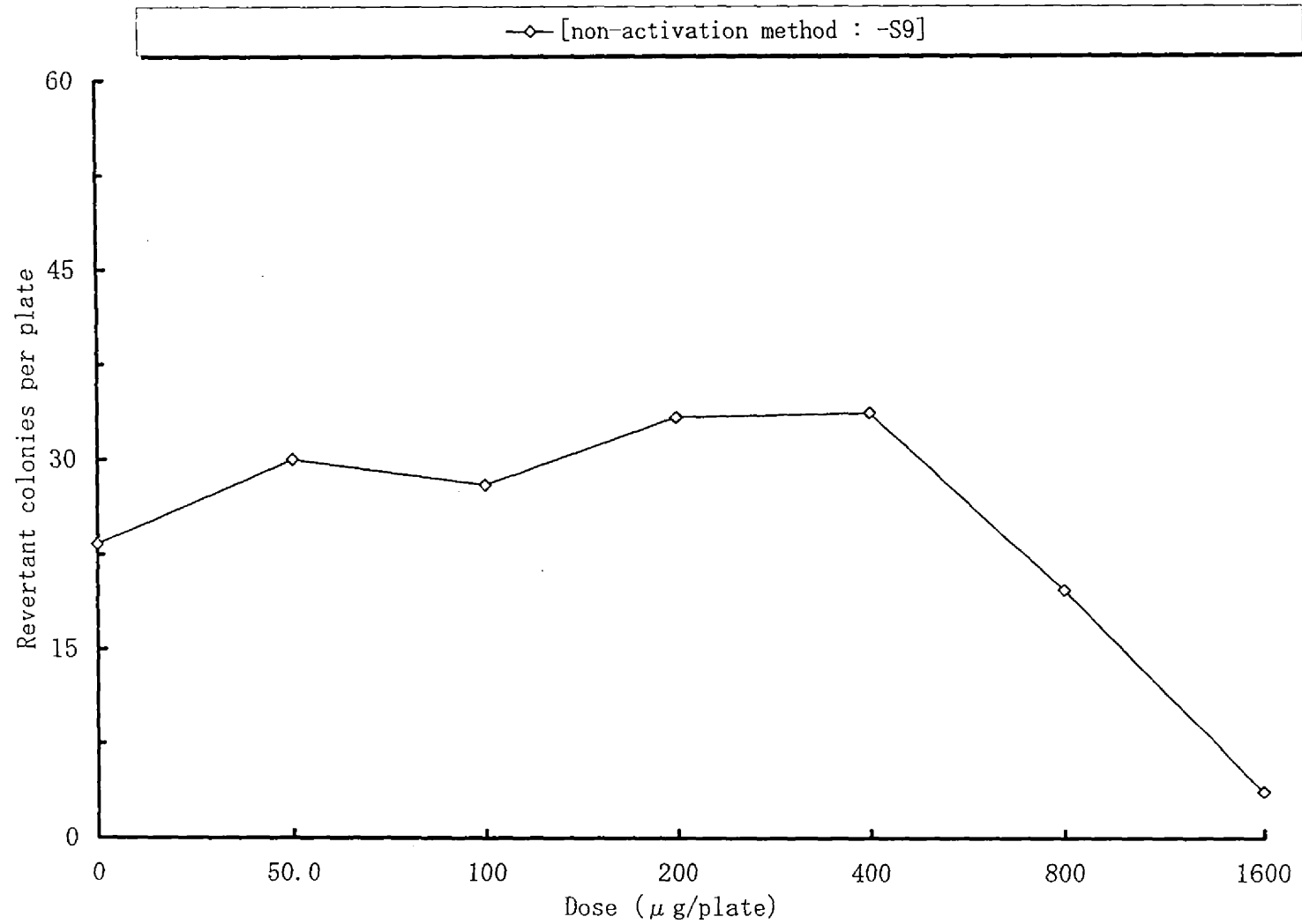


Figure 12. Bacterial reversion test (restudy) of 4-(1-methylethenyl)-phenol in strain WP2uvrA

Table 1. Summary data of dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol
[non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	101 [99	97 \pm]	98 2]	11 [11	11 \pm]	10 1]	19 [19	19 \pm]	18 1]	16 [15	17 \pm]	12 3]	11 [11	10 \pm]	11 1]
	2.29	130 [122	114 \pm]	121 8]	7 [11	12 \pm]	14 4]	31 [28	27 \pm]	25 3]	28 [27	26 \pm]	28 1]	10 [8	8 \pm]	7 2]
	6.86	98 [103	103 \pm]	108 5]	11 [8	7 \pm]	7 2]	19 [23	25 \pm]	24 3]	26 [26	26 \pm]	25 1]	9 [10	14 \pm]	8 3]
	20.6	107 [106	104 \pm]	106 2]	13 [9	7 \pm]	8 3]	19 [18	19 \pm]	17 1]	27 [26	27 \pm]	23 2]	12 [9	7 \pm]	9 3]
	61.7	125 [123	115 \pm]	129 7]	8 [9	13 \pm]	5 4]	24 [24	24 \pm]	23 1]	22 [22	22 \pm]	22 0]	18 [17	15 \pm]	17 2]
	185	109 [111	116 \pm]	109 4]	7 [9	13 \pm]	6 4]	22 [23	22 \pm]	24 1]	14 [13	17 \pm]	8 5]	17 [15	13 \pm]	16 2]
	556	63 * [41	22 * \pm]	37 * 21]	12 * [10	12 * \pm]	6 * 3]	21 [20	19 \pm]	20 1]	19 * [14	12 * \pm]	10 * 5]	8 * [6	7 * \pm]	2 * 3]
	1667	0 * [0	0 * \pm]	0 * 0]	0 * [0	0 * \pm]	0 * 0]	14 * [12	9 * \pm]	14 * 3]	0 * [0	0 * \pm]	0 * 0]	0 * [0	0 * \pm]	0 * 0]
	5000 +	0 * [0	0 * \pm]	0 * 0]	0 * [0	0 * \pm]	0 * 0]	0 * [0	0 * \pm]	0 * 0]	0 * [0	0 * \pm]	0 * 0]	0 * [0	0 * \pm]	0 * 0]
Positive control	600 [587	601 \pm]	559 ^{a)} 24]	502 [516	533 \pm]	513 ^{b)} 16]	157 [163	175 \pm]	156 ^{a)} 11]	567 [623	643 \pm]	658 ^{c)} 49]	259 [290	313 \pm]	297 ^{d)} 28]	

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/plate

c): AF-2, 0.1 μ g/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 2. Summary data of dose-finding study with 4-(1-Methylethenyl)-phenol
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	94	93	93	11	10	8	24	19	28	26	27	27	17	12	14
		[93	\pm	1]	[10	\pm	2]	[24	\pm	5]	[27	\pm	1]	[14	\pm	3]
	2.29	96	103	90	12	14	7	24	21	29	25	28	29	18	18	18
		[96	\pm	7]	[11	\pm	4]	[25	\pm	4]	[27	\pm	2]	[18	\pm	0]
	6.86	103	112	97	8	7	8	23	22	28	38	35	34	17	14	11
		[104	\pm	8]	[8	\pm	1]	[24	\pm	3]	[36	\pm	2]	[14	\pm	3]
	20.6	99	87	89	8	8	8	21	25	21	30	29	32	14	16	15
		[92	\pm	6]	[8	\pm	0]	[22	\pm	2]	[30	\pm	2]	[15	\pm	1]
	61.7	114	117	109	11	10	12	24	18	18	32	33	29	18	15	12
	[113	\pm	4]	[11	\pm	1]	[20	\pm	3]	[31	\pm	2]	[15	\pm	3]	
185	99	110	123	8	8	8	29	24	24	30	29	35	10	9	14	
	[111	\pm	12]	[8	\pm	0]	[26	\pm	3]	[31	\pm	3]	[11	\pm	3]	
556	79 *	95 *	86 *	7 *	7 *	6 *	26	24	33	33	37	32	10 *	12 *	11 *	
	[87	\pm	8]	[7	\pm	1]	[28	\pm	5]	[34	\pm	3]	[11	\pm	1]	
1667	0 *	0 *	0 *	3 *	3 *	7 *	15 *	12 *	13 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
	[0	\pm	0]	[4	\pm	2]	[13	\pm	2]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	
5000 +	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	[0	\pm	0]	
Positive control		910	937	853 ^{a)}	287	279	280 ^{b)}	727	773	834 ^{c)}	408	390	362 ^{d)}	169	156	144 ^{b)}
		[900	\pm	43]	[282	\pm	4]	[778	\pm	54]	[387	\pm	23]	[156	\pm	13]

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate b) : 2-AA, 2 μ g/plate c) : 2-AA, 10 μ g/plate d) : 2-AA, 0.5 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 3. Results of the bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol
[non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	91 [105	118 \pm 14]	106	10 [11	9 \pm 2]	13	28 [23	22 \pm 5]	19	14 [14	14 \pm 0]	14	9 [10	9 \pm 1]	11
	12.5	124 [125	136 \pm 11]	114	6 [6	4 \pm 2]	7				22 [22	24 \pm 2]	21	8 [10	12 \pm 2]	9
	25.0	107 [115	118 \pm 7]	121	8 [7	6 \pm 1]	7				23 [17	17 \pm 6]	12	11 [9	12 \pm 4]	5
	50.0	126 [119	115 \pm 6]	117	6 [9	5 \pm 6]	15	25 [27	24 \pm 4]	32	24 [22	22 \pm 2]	21	6 [6	9 \pm 3]	4
	100	109 [116	109 \pm 12]	130	13 [9	5 \pm 4]	8	33 [30	24 \pm 5]	32	17 [18	18 \pm 1]	19	7 [7	5 \pm 2]	9
	200	119 [113	118 \pm 9]	103	10 [10	8 \pm 2]	11	32 [27	17 \pm 9]	33	25 [23	23 \pm 2]	22	8 [8	9 \pm 2]	6
	400	70 * [75	73 * \pm 6]	82 *	7 * [9	9 * \pm 2]	10 *	37 [36	37 \pm 1]	35	20 [19	14 \pm 4]	22	6 * [6	5 * \pm 1]	6 *
	800	72 * [38	0 * \pm 36]	41 *	0 * [2	0 * \pm 3]	6 *	13 * [19	20 * \pm 5]	23 *	16 * [18	21 * \pm 3]	18 *	1 * [2	3 * \pm 1]	1 *
	1600							6 * [6	0 * \pm 6]	11 *						
Positive control		802 [736	669 \pm 67]	738 ^{a)}	490 [466	459 \pm 22]	448 ^{b)}	275 [261	258 \pm 13]	249 ^{a)}	646 [640	624 \pm 14]	651 ^{c)}	373 [322	257 \pm 59]	337 ^{d)}

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/plate
c): AF-2, 0.1 μ g/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate
* : Growth inhibition was observed

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 4-(1-Methylethenyl)-phenol
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	103	111	95	6	9	11	30	29	29	23	29	22	9	15	16
		[103	\pm	8]	[9	\pm	3]	[29	\pm	1]	[25	\pm	4]	[13	\pm	4]
	12.5	111	98	87	10	7	8				31	21	21	22	21	15
		[99	\pm	12]	[8	\pm	2]				[24	\pm	6]	[19	\pm	4]
	25.0	90	73	109	4	10	13				28	34	23	16	12	15
		[91	\pm	18]	[9	\pm	5]				[28	\pm	6]	[14	\pm	2]
	50.0	99	101	143	9	9	9	34	25	17	33	29	26	8	15	17
		[114	\pm	25]	[9	\pm	0]	[25	\pm	9]	[29	\pm	4]	[13	\pm	5]
100	104	81	122	10	6	5	19	31	39	31	35	38	13	14	12	
	[102	\pm	21]	[7	\pm	3]	[30	\pm	10]	[35	\pm	4]	[13	\pm	1]	
200	121	102	121	10	10	10	33	35	19	26	34	32	17	15	15	
	[115	\pm	11]	[10	\pm	0]	[29	\pm	9]	[31	\pm	4]	[16	\pm	1]	
400	103	103	88	8	9	14	22	21	36	31	23	32	10	14	18	
	[98	\pm	9]	[10	\pm	3]	[26	\pm	8]	[29	\pm	5]	[14	\pm	4]	
800	79 *	81 *	88 *	8 *	5 *	5 *	25 *	18 *	26 *	25 *	20 *	22 *	12 *	13 *	16 *	
	[83	\pm	5]	[6	\pm	2]	[23	\pm	4]	[22	\pm	3]	[14	\pm	2]	
1600							11 *	13 *	10 *							
							[11	\pm	2]							
Positive control		926	1094	1042 ^{a)}	280	280	251 ^{b)}	649	688	554 ^{c)}	468	484	461 ^{d)}	132	133	123 ^{b)}
		[1021	\pm	86]	[270	\pm	17]	[630	\pm	69]	[471	\pm	12]	[129	\pm	6]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate b) : 2-AA, 2 μ g/plate c) : 2-AA, 10 μ g/plate d) : 2-AA, 0.5 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 5. Results of the bacterial reversion test (restudy) of 4-(1-Methylethenyl)-phenol
[non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]					
		TA100			WP2uvrA		
Test substance	0	105 [103	104 \pm]	100 3]	22 [23	27 \pm]	21 3]
	12.5	133 [122	110 \pm]	123 12]			
	25.0	114 [118	132 \pm]	107 13]			
	50.0	112 [113	114 \pm]	113 1]	27 [30	29 \pm]	34 4]
	100	124 [121	126 \pm]	114 6]	22 [28	30 \pm]	32 5]
	200	109 [111	128 \pm]	96 16]	32 [33	33 \pm]	35 2]
	400	80 * [85	80 * \pm]	95 * 9]	33 [34	35 \pm]	33 1]
	800	0 * [0	0 * \pm]	0 * 0]	20 * [20	21 * \pm]	18 * 2]
	1600				0 * [4	0 * \pm]	11 * 6]
Positive control	604 [611	619 \pm]	611 ^{a)} 8]	159 [154	138 \pm]	165 ^{a)} 14]	

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed