



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最終報告書

コハク酸二ナトリウムの細菌を用いた復帰突然変異試験

M-1058

株式会社 **ポリリサーチセンター**

東京本部 〒151-0065 東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所 〒419-0101 静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目 次

	頁
目 次	1
要 約	5
緒 言	6
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び対照物質	7
1-1. 被験物質及び媒体	7
1-2. 被験液の調製	8
1-3. 対照物質	8
2. 供試菌株	10
3. 試 葉	11
4. 試験方法	13
4-1. 識別方法	13
4-2. 前培養条件	13
4-3. 濃度設定試験	14
4-4. 本試験	14
4-5. 追加確認試験	15
5. 判定基準	15
試験結果	16
考 察	18

	頁
参考文献	19

Tables and Figures

Table 1	Results of Dose Range Finding Test without Metabolic Activation	24
Table 2	Results of Dose Range Finding Test with Metabolic Activation	25
Table 3	Results of Main Test with and without Metabolic Activation	26
Figure 1	Concentrations and Number of Revertant Colonies in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100	27
Figure 2	Concentrations and Number of Revertant Colonies in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98	28
Figure 3	Concentrations and Number of Revertant Colonies in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	29
Figure 4	Concentrations and Number of Revertant Colonies in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	30
Figure 5	Concentrations and Number of Revertant Colonies in <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	31

要 約

ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* TA100、TA98、TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いて、コハク酸二ナトリウムにおける突然変異誘発能の有無を検討した。

1.沈殿/結晶

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの濃度においても沈殿/結晶の析出は認められなかった。

2.生育阻害

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの濃度においても試験菌株に対する生育阻害は認められなかった。

3.復帰変異コロニー

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下においてコハク酸二ナトリウムの復帰突然変異誘発能は陰性と判定した。

緒 言

厚生省生活衛生局の依頼により、コハク酸二ナトリウムの細菌を用いる復帰突然変異試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準及びガイドラインに準拠して実施した。

- ・「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令
第4条に規定する試験施設について」
(昭和59年3月31日；環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号連名基準)
一部改正(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)
- ・「『新規化学物質等に係る試験の方法について』の一部改正等について」
(平成9年10月31日；環保安第287号環境庁企画調整局長、衛生第127号厚生省生活衛生局長、平成09・10・31基局第2号通商産業省基礎産業局長連名通知)
- ・“OECD Principles of Good Laboratory Practice” (as revised in 1997)
- ・“OECD Guidelines for Testing of Chemicals Section 4” (1997)

試験材料及び方法

1. 被験物質及び対照物質

1-1. 被験物質及び媒体

1-1-1. 被験物質

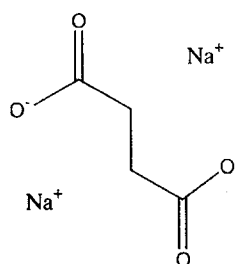
供給者 : 厚生省生活衛生局企画課 生活化学安全対策室

製造者 :

名称 : コハク酸二ナトリウム

CAS番号 : 150-90-3

構造式 :



ロット番号 :

純度 : 99.9%

性状 : 白色結晶性粉末

分子量 : 162.05

安定性 : 経時変化によりわずかに水分が増加する。

保存方法 : 室温、密封 (シリカゲルを入れた容器に保存)

保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所被験物質保存室及び
変異原性試験室

返却 : 被験物質の残量はすべて試験委託者に返却した。

1-1-2. 媒体

名称 : 生理食塩液 [日本薬局方]

ロット番号 : 8I90N

製造元 : 株式会社大塚製薬工場

保存方法 : 室温

保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

1-2. 被験液の調製

- 調製方法 : 無菌的操作によりコハク酸二ナトリウムを採取し、濃度設定試験は 50mg/mL(適用濃度: 5000 μ g/plate)を最高用量として生理食塩液により以下公比 4 で 7 段階希釈した計 8 濃度 (0.00305、0.0122、0.0488、0.195、0.781、3.13、12.5 及び 50.0mg/mL) を設定した。本試験は、濃度設定試験において菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、菌の増殖抑制が認められなかったため、50mg/mL(適用濃度: 5000 μ g/plate)を最高用量として生理食塩液により以下公比 2 で希釈した計 6 濃度 (1.56、3.13、6.25、12.5、25.0 及び 50.0mg/mL) を設定した。なお、被験液は用時調製とした。
- 保存方法 : 室温、遮光
- 安定性 : 被験物質に媒体を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等は認められなかった。

1-3. 対照物質

1) 溶媒対照 (陰性対照)

- 名称 : 生理食塩液 [日本薬局方]
- ロット番号 : 8I90N
- 製造元 : 株式会社大塚製薬工場
- 保存方法 : 室温
- 保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

2) 陽性対照

- 名称 : AF-2 (2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide)
- ロット番号 : PAN0050
- 製造元 : 和光純薬工業株式会社
- 保存方法 : 室温、遮光

名 称 : SAZ (Sodium azide)

ロット番号 : TPG6789

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

保存方法 : 室温、遮光

名 称 : ICR-191 (2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino] acridine · 2HCl)

ロット番号 : 465901

製 造 元 : Polysciences, Inc.

保存方法 : 冷蔵

名 称 : 2AA (2-aminoanthracene)

ロット番号 : M7K7000

製 造 元 : ナカライテスク

保存方法 : 冷蔵

名 称 : B[a]P (Benzo[a]pyrene)

ロット番号 : M5K8326

製 造 元 : ナカライテスク

保存方法 : 室温、遮光

保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

(1) 調製方法

以下の処理濃度となるように、AF-2、ICR-191、2AA、B[a]P は DMSO (和光純薬工業株式会社、試薬特級、Lot No. : KSM3999)、SAZ は、注射用水 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、Lot No. : 8I79N) により溶解し、目的濃度に調製した。

対象菌株	陽性対照物質（処理量 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ）	
	非代謝活性化（-S9）	代謝活性化（+S9）
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	AF-2（0.01）	B[a]P（5.0）
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	AF-2（0.1）	B[a]P（5.0）
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	SAZ（0.5）	2AA（2.0）
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	ICR-191（1.0）	B[a]P（5.0）
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2（0.01）	2AA（10.0）

(2) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験のガイドラインに準じて選択した。

2. 供試菌株

1) 供試菌株

次の5種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

Salmonella typhimurium TA100

Salmonella typhimurium TA1535

Escherichia coli WP2 *uvrA*

フレームシフト型

Salmonella typhimurium TA98

Salmonella typhimurium TA1537

2) 入手先及び入手年月日

Salmonella typhimurium TA100 : 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
1997年10月9日 入手

Salmonella typhimurium TA98 : 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
1997年10月9日 入手

Salmonella typhimurium TA1535 : 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
1997年10月9日 入手

Salmonella typhimurium TA1537 : 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
1997年10月9日 入手

Escherichia coli WP2 *uvrA* : 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
1997年10月9日 入手

3) 菌株の選択理由

毒性試験のガイドラインに準じて選択した。当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている。

4) 菌株の保存

菌懸濁液 0.8mL に対して DMSO 0.07mL の割合で加え、分注後 -80℃ で保存した。

3. 試薬

1) S9

名 称 : S9 (Cofactor A set)
 ロット番号 : 99121609
 製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
 製造日 : 1999年12月16日
 購入日 : 2000年2月2日
 種・系統 : ラット・SD系
 性 : 雄
 週 齢 : 7週齢
 体 重 : 202.4±8.2 g
 誘導物質 : フェノバルビタール (PB) & 5,6-ベンゾフラボン (BF)
 投与方法 : 腹腔内投与
 投与期間及び投与量
 : PB 4日間 30+60+60+60mg/kg body weight
 : BF 1日間 80mg/kg body weight
 保存方法 : 冷凍保存 (約-80℃)
 保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

2) Cofactor

名 称 : Cofactor (Cofactor A set)
 ロット番号 : A99121307
 製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
 保存方法 : 冷凍保存 (約-80℃)
 保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

3) S9 mix の組成

S9	1 mL		
Cofactor	9 mL	0.4M 塩化マグネシウム水溶液	0.2 mL
		1.65M 塩化カリウム水溶液	0.2 mL
		1.0M グルコース-6-リン酸水溶液	0.05 mL
		0.1M 還元型ニコチンアミド・アデニン ジヌクレオチドリン酸(NADPH)水溶液	0.4 mL
		0.1M 還元型ニコチンアミド・アデニン ジヌクレオチド(NADH)水溶液	0.4 mL
		0.2M ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)	5.0 mL
		精製水	2.75 mL

4) トップアガー

名 称 : BACTO-AGAR
 ロット番号 : 108481JA
 製造元 : DIFCO LABORATORIES
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

5) 最少グルコース寒天平板培地

名 称 : 最少グルコース寒天培地 BZ
 ロット番号 : BZ010BP
 製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
 保存方法 : 15~25℃
 保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

4. 試験方法¹⁻⁵⁾

4-1. 識別方法

1) 菌株の識別

<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	青
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	緑
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	桃
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	赤
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	黄

2) 濃度の識別

溶媒対照を「SC」(Solvent Control)、陽性対照を「PC」(Positive Control)とし、被験物質処理群の濃度の低い方から「1」「2」「3」「4」「5」「6」…と番号をつけた。なお、非代謝活性化は「-」、代謝活性化は「+」をそれぞれ番号の前につけた。

4-2. 前培養条件

1) ニュートリエントブロス

名 称	: Nutrient Broth No.2
ロット番号	: 59365
製造元	: OXOID
保存方法	: 室温
保存場所	: 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

2) 振盪培養装置

型 式	: BIOSPIN MBS-1
製造元	: 東京理化器械株式会社(EYELA)

3) 前培養方法

無菌的操作により培養用三角フラスコにニュートリエントブロス 30mL を分注し、以下に示す凍結保存菌懸濁液を接種した。

<i>Salmonella typhimurium</i> TA 株 :	60 μ L
<i>Escherichia coli</i> 株 :	30 μ L

これを 37℃ で約 8 時間前培養した後に吸光度を測定し、この吸光度から換算した理論生菌数が 1×10^9 個/mL 以上の菌濃度であることを確認し供試菌懸濁液とした。

前培養終了後に測定した O.D. 値より換算した生菌数

菌株	濃度設定試験	本試験
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	1.42×10^9 /mL	1.38×10^9 /mL
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	2.22×10^9 /mL	2.18×10^9 /mL
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	2.02×10^9 /mL	1.98×10^9 /mL
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	1.76×10^9 /mL	1.69×10^9 /mL
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	4.33×10^9 /mL	4.22×10^9 /mL

4-3. 濃度設定試験

被験物質の 5000 μ g/plate を最高用量とし、以下公比 4 で希釈した計 8 濃度(0.305、1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250 及び 5000 μ g/plate)の濃度設定試験を実施した。

操作は、被験液 0.1mL に非代謝活性化においては 0.1M ナトリウムーリン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5mL、代謝活性化においては S9 mix 0.5mL を加え、更に各菌懸濁液 0.1mL を加えた。37℃ で 20 分間振盪し(プレインキュベーション)、これにトッパアガーを 2.0mL 加えた後に最少グルコース寒天平板培地に重層した。37℃ で 48 時間培養した後、試験菌株の生育阻害及び沈殿/結晶の析出の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。この結果、菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、全被験物質処理群において沈殿/結晶の析出が認められなかったため、出現した復帰変異コロニーをコロニーカウンター(バイオマルチスキャナーBMS-400、東洋測器)を用いて計数した。

なお、トッパアガーは、*Salmonella typhimurium* TA 株を用いる場合は 0.5mM D-ビオチン-0.5mM ヒスチジン溶液を 1/10 容、また *Escherichia coli* 株を用いる場合には 0.5mM L-トリプトファン溶液を同割合で軟寒天液(0.6% Agar, 0.6% NaCl)に加えたものを用いた。また、最少グルコース寒天平板培地は各用量につき 3 plate 設けた。

4-4. 本試験

濃度設定試験の結果、すべての処理用量において試験菌株の生育阻害が認められなかったため、被験物質の 5000 μ g/plate を最高用量とし、以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6

濃度（156、313、625、1250、2500 及び 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ）の用量について本試験を実施した。なお、試験操作は濃度設定試験と同条件とし、濃度設定試験結果と本試験結果の判定の再現性を確認した。

4-5. 追加確認試験

追加確認試験の必要性が認められなかったため実施しなかった。

5. 判定基準

結果の判定は、被験物質処理における復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数に対して顕著に増加し（溶媒対照の2倍を目安とした）、この増加に用量反応性が認められ、また濃度設定試験・本試験の各判定に再現性が認められた場合に陽性と判定した。なお、判定に際しては統計学的処理は行わなかった。

試験結果

1. 濃度設定試験

濃度設定試験の結果を Table 1, 2 及び Figure 1~5 (上段) に示した。

1) 培養終了前後の観察結果

重層処理直後の肉眼による観察及び培養終了後の肉眼と実体微鏡による観察のいずれにおいても、菌株及び代謝活性化の有無に関わらず、コハク酸二ナトリウムを処理した全ての寒天培地シャーレにおいて、結晶/沈殿の析出は認められなかった。また、培養終了後の観察において、菌株及び代謝活性化の有無に関わらず、菌の生育阻害は観察されなかった。

2) 復帰変異コロニー数

コハク酸二ナトリウムを処理した全用量群について、溶媒対照と比較して2倍以上及び用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

3) 試験系の成立条件

陽性対照群では各菌株の溶媒対照に比較して2倍以上の復帰変異コロニーが認められた。

全ての用量群について3枚のシャーレによる復帰変異コロニー数に顕著な差は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかった。

各菌株の代謝活性化の存在下及び非存在下における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は試験実施施設における背景データ (Attached Data 3) との比較において異常と考えられる数値を認めなかった。

2. 本試験

本試験の結果を Table 3 及び Figure 1~5 (下段) に示した。

1) 濃度設定理由

濃度設定試験の結果、菌株及び代謝活性化の有無に関わらず、コハク酸二ナトリウムを処理した全用量群において菌の生育阻害が認められなかったことから、被験物質濃度は、濃度設定試験において最高用量として設定した 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を本試験の最高

用量として公比2で5段階希釈した計6段階(156、313、625、1250、2500及び5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$)を設定した。

2) 培養終了前後の観察結果

重層処理直後の肉眼による観察及び培養終了後の肉眼と実体微鏡による観察のいずれにおいても、菌株及び代謝活性化の有無に関わらず、コハク酸二ナトリウムを処理した全ての寒天培地シャーレにおいて、結晶/沈殿の析出は認められなかった。また、培養終了後の観察において、菌株及び代謝活性化の有無に関わらず、菌の生育阻害は観察されなかった。

3) 復帰変異コロニー数

コハク酸二ナトリウムを処理した全用量群について、溶媒対照と比較して2倍以上及び用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

4) 試験系の成立条件

陽性対照群では各菌株の溶媒対照に比較して2倍以上の復帰変異コロニーが認められた。

全ての用量群について3枚のシャーレによる復帰変異コロニー数に顕著な差は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかった。

各菌株の代謝活性化の存在下及び非存在下における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は試験実施施設における背景データ(Attached Data 3)との比較において異常と考えられる数値を認めなかった。

考 察

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、コハク酸二ナトリウムを処理したすべての寒天培地シャーレにおいて菌の生育阻害が観察されなかったことから、本被験物質の供試菌株に対する毒性は低いものと考えられた。

また、濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、菌株、被験物質濃度及び代謝活性化の有無にかかわらず、溶媒対照と比較して2倍以上及び用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、本被験物質の復帰突然変異誘発能は陰性であることが示唆された。一方、陽性対照群では各菌株の溶媒対照群に比較して2倍以上の復帰変異コロニーが認められたことから、供試菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認された。更に、各菌株の代謝活性化及び非代謝活性化における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は試験実施施設における背景データ(Attached Data 3)との比較において異常と考えられる数値を認めず、試験は適切に実施されたものと考えた。

以上の結果より、コハク酸二ナトリウムは本試験条件下において復帰突然変異誘発能を有しないと判断した。

参考文献

- 1) Bruce N.Ames, Joyce McCann and Edith Yamasaki.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research. 31.347-364.1975
- 2) Dorothy M.Maron and Bruce N.Ames.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research. 113.173-215.1983
- 3) 石館基監修、能美健彦、松井道子編集：微生物を用いる変異原性試験データ集、株式会社エル・アイ・シー、1991
- 4) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集：厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A、サイエンティスト社、1992
- 5) 日本バイオアッセイ研究センター編集：微生物を用いる変異原性試験手法解説、富士オフセット株式会社、1999

Table 1 Results of Dose Range Finding Test without Metabolic Activation

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance concentration (μ g/plate)	Number of revertant (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Solvent control	113	11	28	24	12
		109 (112)	15 (14)	23 (26)	21 (22)	12 (12)
		113	15	27	20	13
	0.305	113	11	21	20	11
		108 (114)	16 (13)	24 (23)	20 (20)	11 (12)
		121	11	23	21	15
	1.22	110	16	25	28	11
		102 (104)	11 (13)	31 (26)	24 (24)	16 (14)
		100	13	23	21	15
	4.88	105	11	25	31	15
		134 (118)	15 (14)	28 (27)	23 (25)	16 (16)
		114	15	27	21	17
19.5	100	15	21	21	16	
	126 (113)	15 (15)	27 (24)	27 (23)	12 (13)	
	114	15	24	20	12	
78.1	110	9	29	23	15	
	101 (105)	11 (10)	29 (28)	20 (21)	13 (15)	
	105	11	25	21	16	
313	104	17	24	23	13	
	117 (115)	12 (15)	23 (25)	25 (23)	13 (12)	
	125	16	27	20	11	
1250	112	11	29	21	12	
	105 (109)	11 (11)	25 (26)	24 (24)	15 (14)	
	110	11	23	28	16	
5000	106	12	28	23	11	
	121 (110)	12 (12)	27 (26)	25 (24)	15 (12)	
	102	11	24	25	11	
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2#1	SAZ#2	AF-2	AF-2	ICR-191#3
	Concentration (μ g/plate)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of colonies/plate	890 815 (856) 862	359 392 (371) 362	132 157 (149) 158	491 427 (442) 407	1790 1809 (1805) 1815

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, #2: Sodium azide.

#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine.2HCl

() : Mean of 3 plates. Rounded to the nearest whole number.

Deposition of crystals and growth inhibition of tester strains were not seen at any dose levels.

Table 2 Results of Dose Range Finding Test with Metabolic Activation

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance concentration (μ g/plate)	Number of revertant (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Solvent control	118	11	36	35	12
		122 (119)	13 (12)	27 (32)	41 (36)	16 (14)
		118	12	33	33	13
	0.305	113	15	31	35	19
		130 (117)	15 (14)	27 (29)	33 (32)	12 (14)
		109	11	29	28	12
	1.22	113	12	33	27	16
		104 (106)	11 (11)	31 (32)	31 (30)	16 (14)
		102	11	31	31	11
	4.88	126	11	25	33	11
128 (129)		15 (14)	32 (31)	33 (33)	16 (13)	
134		17	35	33	11	
19.5	113	13	36	37	11	
	109 (113)	11 (12)	35 (34)	40 (39)	16 (14)	
	117	12	32	39	16	
78.1	129	11	28	28	16	
	120 (116)	12 (13)	28 (29)	37 (34)	11 (14)	
	100	15	31	36	15	
313	113	11	32	33	12	
	100 (110)	13 (13)	27 (29)	27 (30)	16 (14)	
	118	16	29	31	13	
1250	136	11	24	33	12	
	117 (121)	16 (13)	24 (25)	29 (30)	16 (15)	
	110	12	28	28	17	
5000	113	13	32	36	16	
	121 (116)	11 (14)	31 (29)	33 (32)	15 (16)	
	113	17	25	28	17	
Positive control requiring S9 mix	Name	B[a]P ^{#4}	2AA ^{#5}	2AA	B[a]P	B[a]P
	Concentration (μ g/plate)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of colonies/plate	818 811 (844) 904	217 196 (206) 206	404 491 (435) 411	241 239 (232) 217	92 89 (87) 80

#4: Benzo[a]pyrene, #5: 2-Aminoanthracene

() : Mean of 3 plates. Rounded to the nearest whole number.

Deposition of crystals and growth inhibition of tester strains were not seen at any dose levels.

Table 3 Results of Main Test with and without Metabolic Activation

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance concentration (μ g/plate)	Number of revertant (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Solvent control	118	11	28	21	15
		114 (111)	11 (13)	27 (26)	24 (22)	11 (12)
		101	16	24	20	11
	156	109	15	25	21	11
		104 (109)	11 (14)	21 (24)	21 (21)	12 (13)
		113	15	25	21	15
	313	114	13	29	19	12
112 (112)		12 (13)	24 (25)	19 (20)	13 (12)	
109		13	21	23	11	
625	108	11	29	20	11	
	104 (106)	13 (12)	21 (25)	19 (20)	15 (13)	
	106	12	25	21	12	
1250	112	12	25	21	13	
	110 (113)	12 (13)	28 (25)	21 (22)	12 (14)	
	117	16	23	23	17	
2500	105	13	25	20	16	
	109 (108)	13 (12)	20 (24)	25 (23)	11 (14)	
	109	11	27	24	16	
5000	108	15	31	25	16	
	118 (110)	13 (14)	24 (26)	29 (25)	12 (14)	
	105	15	24	20	13	
S9 mix (+)	Solvent control	112	17	24	35	12
		102 (113)	11 (13)	27 (25)	33 (33)	16 (15)
		124	12	24	31	16
	156	121	16	29	32	17
		130 (120)	12 (13)	29 (28)	35 (35)	13 (14)
		109	12	25	39	12
	313	101	11	21	27	19
110 (113)		15 (12)	25 (24)	31 (32)	13 (15)	
128		11	25	39	13	
625	121	12	28	33	12	
	112 (119)	19 (15)	23 (26)	29 (30)	16 (13)	
	124	13	27	28	12	
1250	114	12	25	36	11	
	109 (119)	13 (12)	24 (26)	37 (35)	12 (13)	
	134	11	29	32	16	
2500	125	11	29	33	17	
	100 (115)	13 (12)	29 (28)	35 (32)	13 (14)	
	120	11	25	28	13	
5000	132	12	20	27	16	
	101 (112)	13 (12)	29 (24)	31 (31)	19 (16)	
	104	12	24	35	13	
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2#1	SAZ#3	AF-2	AF-2	ICR-191#5
	Concentration (μ g/plate)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of colonies/plate	853 859 (844) 819	384 408 (397) 399	145 145 (153) 168	487 485 (480) 468	1803 1810 (1813) 1825
Positive control requiring S9 mix	Name	B[a]P#2	2AA#4	2AA	B[a]P	B[a]P
	Concentration (μ g/plate)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of colonies/plate	907 815 (872) 894	157 170 (174) 196	485 402 (428) 398	250 251 (245) 235	97 88 (91) 88

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, #2: Benzo[a]pyrene, #3: Sodium azide.

#4: 2-Aminoanthracene, #5: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine.2HCl

() : Mean of 3 plates. Rounded to the nearest whole number.

Deposition of crystals and growth inhibition of tester strains was not seen at any dose levels.

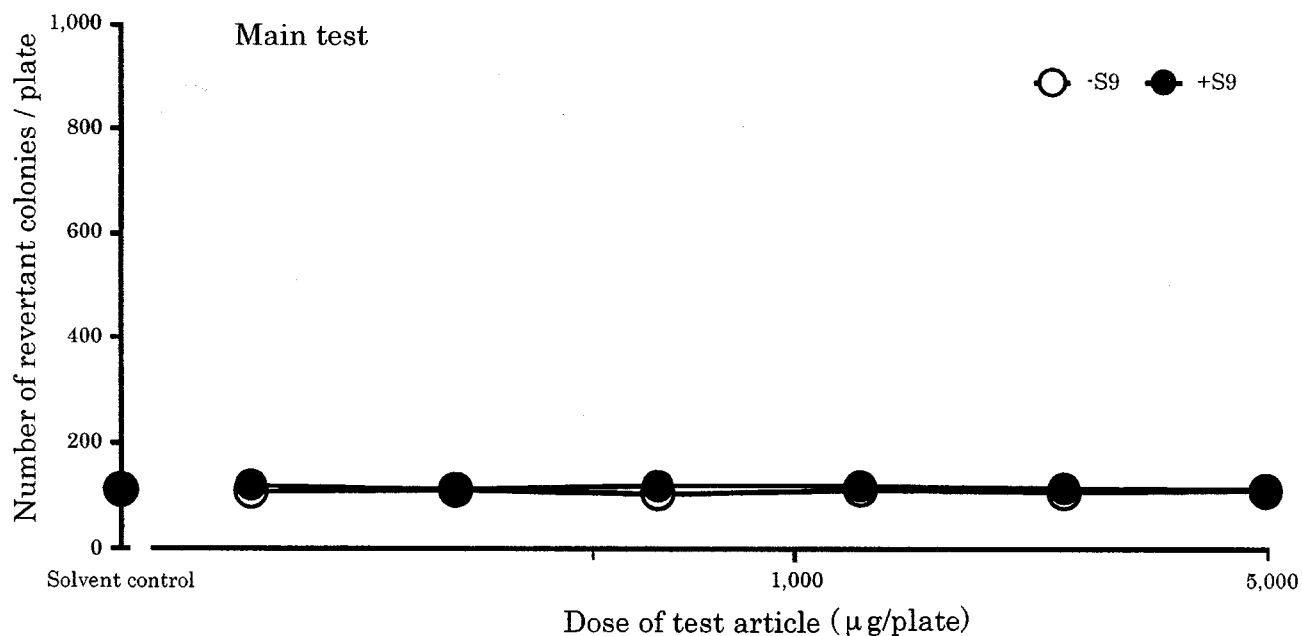
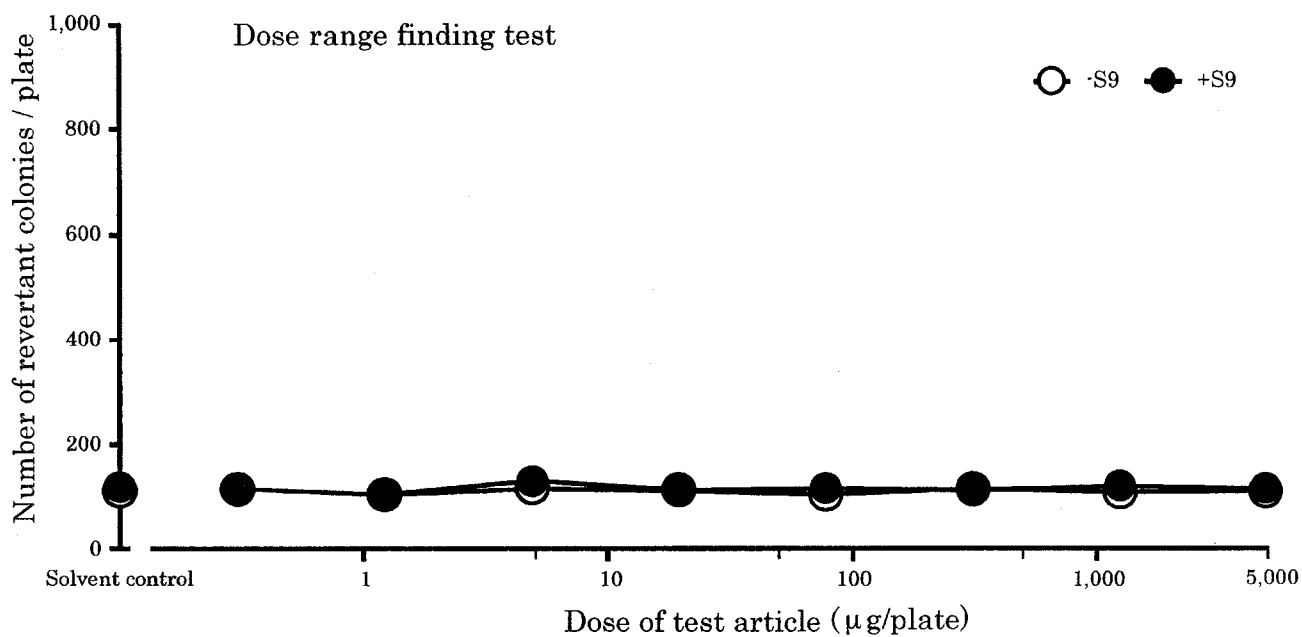


Figure 1

Concentrations and Number of Revertant Colonies
in *Salmonella typhimurium* TA100

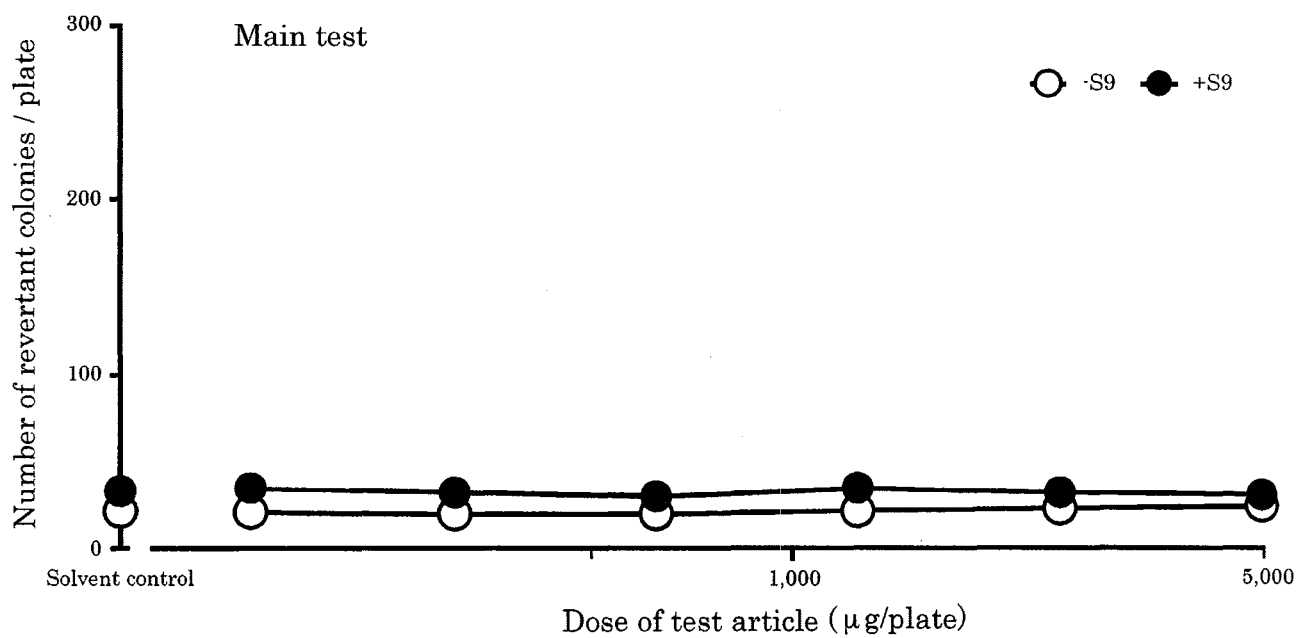
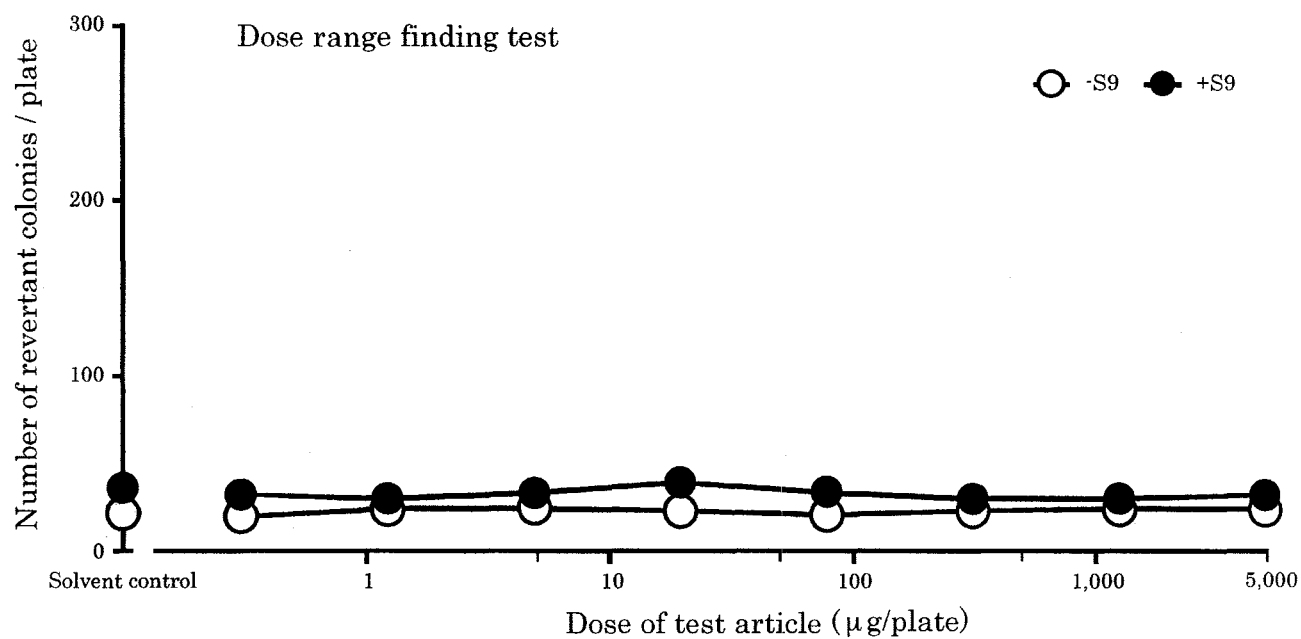


Figure 2

Concentrations and Number of Revertant Colonies
in *Salmonella typhimurium* TA98

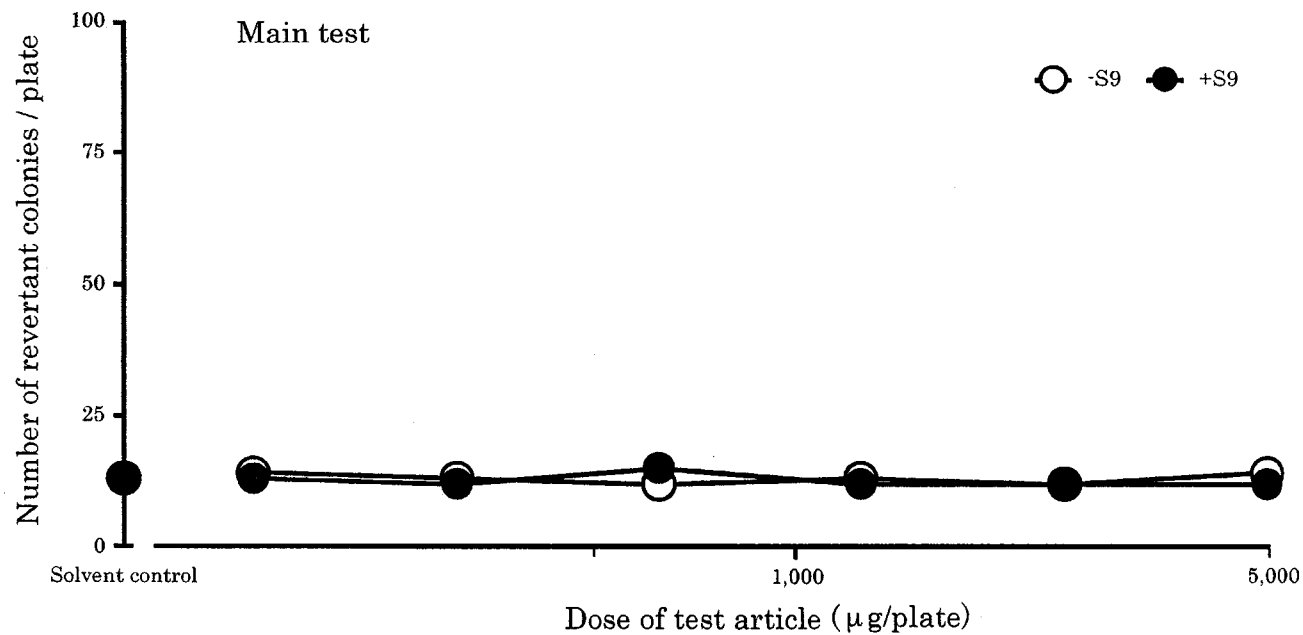
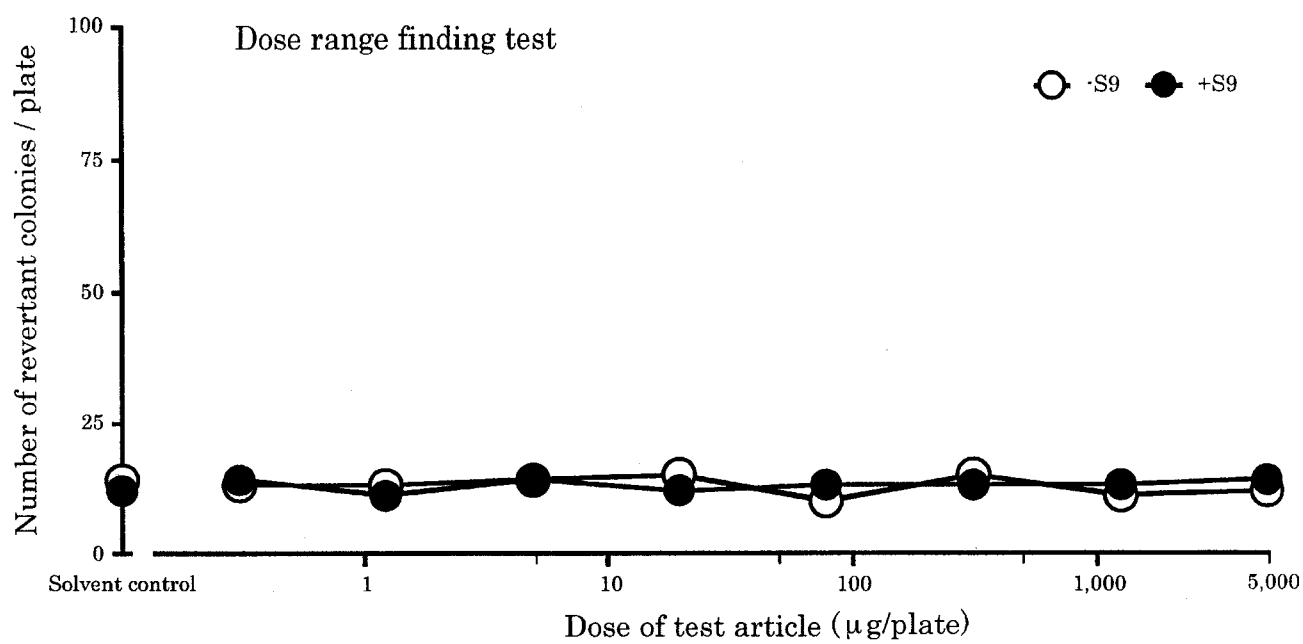


Figure 3

Concentrations and Number of Revertant Colonies
in *Salmonella typhimurium* TA1535

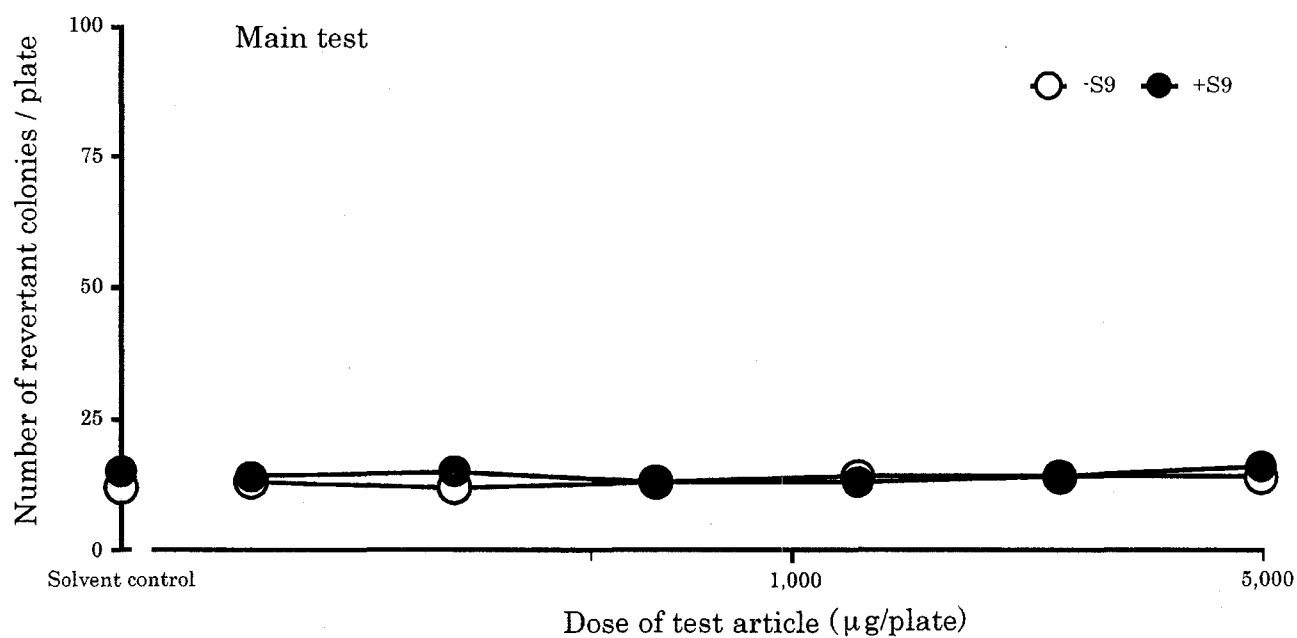
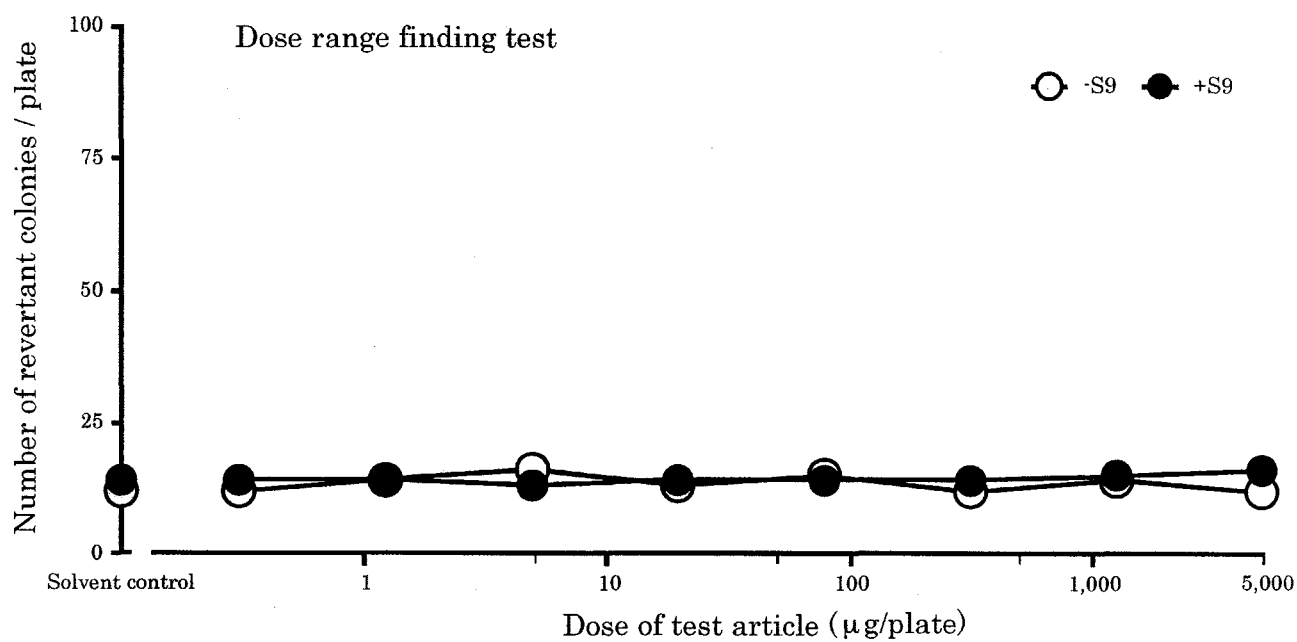


Figure 4

Concentrations and Number of Revertant Colonies
in *Salmonella typhimurium* TA1537

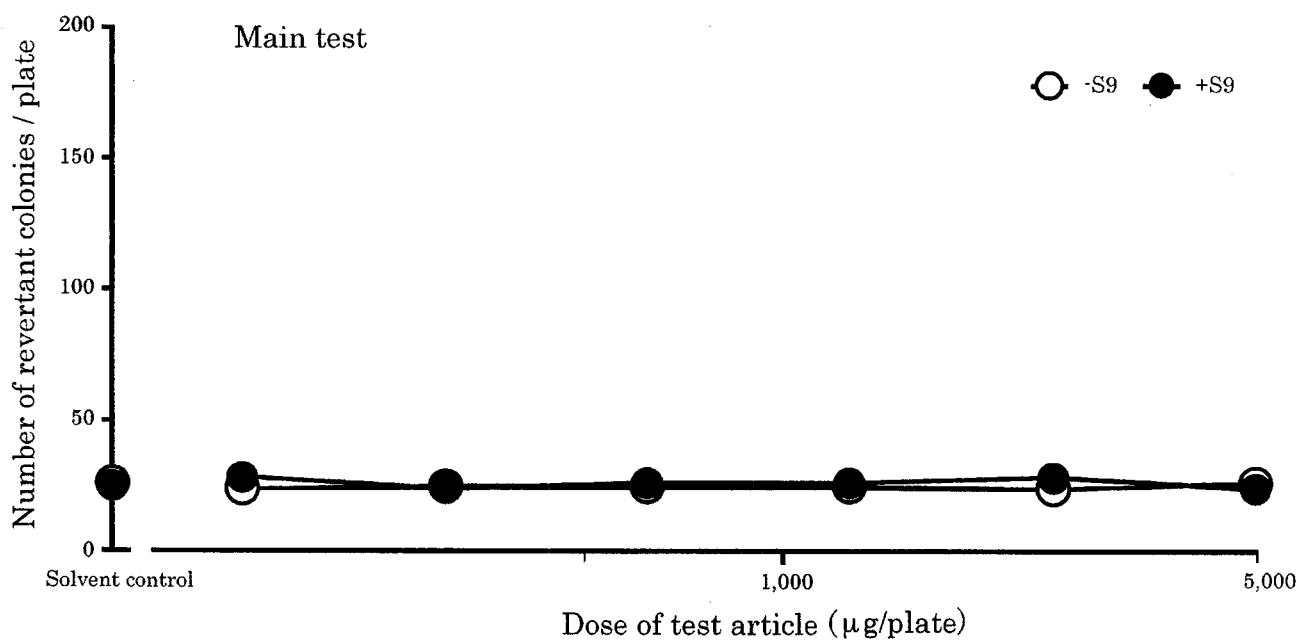
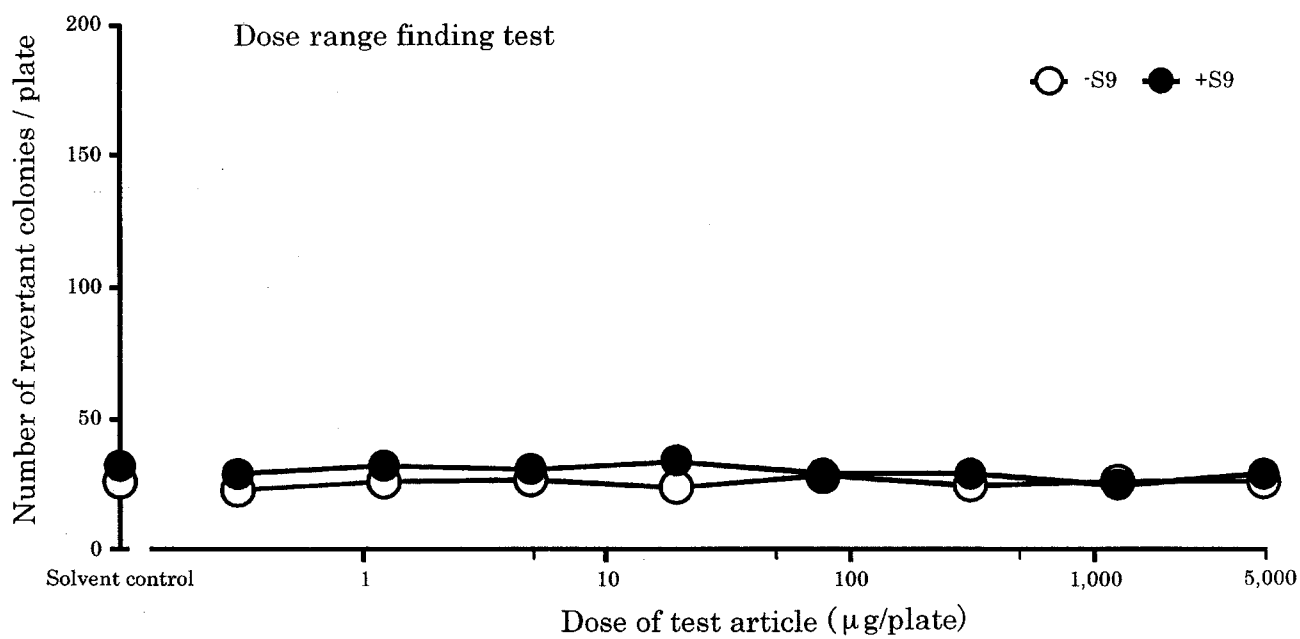


Figure 5

Concentrations and Number of Revertant Colonies
in *Escherichia coli* WP2 *uvrA*