

---

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの細菌を用いる復帰突然変異試験

---

最 終 報 告 書

作成日 2006年 11月 13日

株式会社日本バイオリサーチセンター  
羽島研究所

## 目 次

要 約	.....	8
緒 言	.....	9
方 法	.....	9
1. 被験物質, 媒体, 陽性対照物質及び陰性対照物質	.....	9
2. 検体液	.....	10
3. 試験菌株	.....	11
4. S9 mix	.....	11
5. 培地	.....	12
6. 無菌試験	.....	12
7. 試験方法	.....	12
8. 試験の成立条件	.....	13
9. 統計学的方法	.....	13
10. 判定基準	.....	13
試験成績	.....	14
1. 用量設定試験	.....	14
2. 本試験(I)及び本試験(II)	.....	14
考 察	.....	15
文 献	.....	16

## Attachment, Table及びFigureの目次

Table 1.	Reverse mutation test of 1,1'- (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene in bacteria (dose-finding test)	.....	21
Table 2-1.	Reverse mutation test of 1,1'- (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test I: -S9 mix)	.....	22
Table 2-2.	Reverse mutation test of 1,1'- (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test I: +S9 mix)	.....	23
Table 3-1.	Reverse mutation test of 1,1'- (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test II: -S9 mix)	.....	24
Table 3-2.	Reverse mutation test of 1,1'- (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix)	.....	25
Figure 1-1.	Reverse mutation test of 1,1'- (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene in bacteria (dose-finding test : -S9 mix)	.....	26
Figure 1-2.	Reverse mutation test of 1,1'- (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene in bacteria (dose-finding test : +S9 mix)	.....	27
Figure 2-1.	Reverse mutation test of 1,1'- (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test I: -S9 mix)	.....	28
Figure 2-2.	Reverse mutation test of 1,1'- (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test I: +S9 mix)	.....	29
Figure 3-1.	Reverse mutation test of 1,1'- (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test II: -S9 mix)	.....	30
Figure 3-2.	Reverse mutation test of 1,1'- (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix)	.....	31

## 要 約

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの遺伝子突然変異誘発性の有無を, *Salmonella typhimurium*のTA100, TA98, TA1535及びTA1537並びに*Escherichia coli*のWP2uvrAを用い, プレインキュベーション法による復帰突然変異試験により検討した. 試験は, S9 mix無添加とS9 mix添加の場合について実施した.

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの2.44~5000 µg/plate濃度における復帰変異コロニー数は, 本試験(I)及び本試験(II)において, いずれの菌株ともS9 mix無添加及びS9 mix添加の場合にかかわらず, 陰性対照の2倍未満であった. 陽性対照物質は, S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合のいずれにおいても, 明らかな陽性結果を示した. 本試験(I)及び本試験(II)の結果には再現性が認められた.

以上の結果, 当試験の条件下において, 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する.

## 緒 言

2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンの細菌を用いる復帰突然変異試験を行い、その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した。

## 方 法

### 1. 被験物質, 媒体, 陽性対照物質及び陰性対照物質

#### 1.1. 被験物質

被験物質の2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテン [英語名称: 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene, 英語別名: 2,4-Diphenyl-4-methyl-1-pentene, CAS No.6362-80-7, 分子量: 236.36, 沸点: 310°C, 気圧: 11 Pa (170°C), 揮発性: なし, 融点: -82°C以下, 比重: 0.975 (20°C)] は、無色透明の液体でスチレン臭がある。当試験には、  
から入手したもの [含量: 96.97 % (不純物: 2,4-Diphenyl-4-methyl-2-pentene 2.54%) ] を用いた。入手後は、試験施設の被験物質保管室の保管庫内に室温 (設定: 23°C, 実測値: 20.0~25.3°C) ・遮光の条件下で保管した。

2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(試験番号:100524)の投与期間終了後に製造元で被験物質を再分析した結果、含量は96.9%であり、使用期間中の安定性が確認された。

#### 1.2. 媒体

媒体には、ジメチルスルホキシド [以下DMSO, 紫外吸収スペクトル用, ロット番号: PU140, 使用期限: 2009年2月26日(自社規定), 株式会社同仁化学研究所] を用いた。DMSOは、使用時まで試験施設の被験物質保管室の保管庫内に、室温(設定: 23°C, 実測値: 20.7~24.8°C) ・遮光の条件下で保管した。

#### 1.3. 陽性対照物質

##### 1.3.1. 2-アミノアントラセン (2-aminoanthracene, 略名: 2AA)

ロット番号: 90K3670, 緑色から金色の粉末, 純度: 97.4 %, Sigma-Aldrich CO.,使用期限: 2007年1月7日(自社規定),保管条件: 冷蔵(設定: 4°C, 冷蔵庫: MPR-311D, 三洋電機株式会社) ・防湿

##### 1.3.2. アジ化ナトリウム (sodium azide, 略名: NaN<sub>3</sub>)

ロット番号: M3H9553, 純度: 99.8 %, ナカライテスク株式会社, 使用期限: 2008年9月1日(自社規定), 保管条件: 冷蔵(設定: 4°C, 冷蔵庫: MPR-311D, 三洋電機株式会社) ・防湿 ・遮光

##### 1.3.3. 9-アミノアクリジン (9-aminoacridine hydrochloride, 略名: 9AA)

ロット番号: M3N4147, 純度: 97.6 %, ナカライテスク株式会社, 使用期限: 2008年10月13日(自社規定), 保管条件: 冷蔵(設定: 4°C, 冷蔵庫: MPR-311D, 三洋電機株式会社)

## 1.3.4. 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド [2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 略名:AF-2]

ロット番号:SEL1402, 黄みの赤色結晶性粉末, 含量:99.0%, 和光純薬工業株式会社, 使用期限:2007年2月4日(自社規定),保管条件:冷蔵(設定:4℃, 冷蔵庫:MPR-311D, 三洋電機株式会社)・遮光

## 1.4. 陰性対照物質

陰性対照物質は, 被験物質の媒体として用いたDMSOとした。

## 2. 検体液

## 2.1. 被験物質

用量設定試験, 本試験(I)及び本試験(II)のいずれの場合も, 被験物質の必要量を秤量(電子天秤:AT261, メトラー・トレド株式会社)し, DMSOに溶解して最高濃度液(50 mg/mL)を調製した。最高濃度液より低い濃度液は, 最高濃度液からDMSOで順次希釈して調製した。調製は用時に行い, 使用後の残液は廃棄処分した。

## 2.2. 陽性対照物質

2AA, 9AA及びAF-2はDMSO(紫外吸収スペクトル用, ロット番号:2AA及びAF-2; NJ151, 9AA; PU140, 株式会社同仁化学研究所)に,  $\text{NaN}_3$ は注射用水(局方品, ロット番号: K2K75, 株式会社大塚製薬工場)に溶解して, 以下に示す濃度液を調製した(2AAの調製日:2004年4月9日, 9AA及び $\text{NaN}_3$ の調製日:2004年7月2日, AF-2の調製日:2004年8月6日, 各調製液の使用期限は調製後1年以内とした)。

各調製液は, チューブ(2 mL容セラムチューブ, 住友ベークライト株式会社)に0.5 mLずつ分注し, 冷凍庫[型式:MDF-291AT(検体保管庫 No.8), 三洋電機株式会社]内に冷凍保管(設定:-85℃, 実測値:-88~-79℃)した。試験の際には各調製液を融解して使用し, 使用後の残液は廃棄処分した。

	菌株名	物質名	調製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	試験濃度 ( $\mu\text{g/plate}$ )
S9 mix (+)	TA100	2AA	10	1
	TA1535	2AA	20	2
	WP2 <i>uvrA</i>	2AA	100	10
	TA98	2AA	5	0.5
	TA1537	2AA	20	2
S9 mix (-)	TA100	AF-2	0.1	0.01
	TA1535	$\text{NaN}_3$	5	0.5
	WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1	0.01
	TA98	AF-2	1	0.1
	TA1537	9AA	800	80

### 3. 試験菌株

試験菌株には、国内各GLP準拠毒性試験ガイドラインにおいて規定されており、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*S.typhimurium*のTA100, TA98, TA1535及びTA1537並びに*E.coli*のWP2*uvrA*を使用した。TA100及びTA98は1996年10月18日に、TA1535, TA1537及びWP2*uvrA*は1995年2月25日に、いずれも中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センターから入手した。

菌株の特性として「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインとGLP-」<sup>1)</sup>に従い、アミノ酸要求性(*S.typhimurium*の場合は、2 mLの0.5 mmol/L D-ビオチンを含むトップアガーで、*E.coli*の場合には2 mLのプレートのトップアガーで最少グルコース寒天平板培地に、通常行っている試験方法で前培養した菌懸濁液0.1 mLと共に重層し、48時間培養して0.1 mL中に含まれる復帰変異コロニー数を調べた)、紫外線感受性、膜変異*rfa*特性及び薬剤耐性因子R-factorプラスミドの有無を検査し(TA100及びTA98の検査日：2004年2月25日～2月27日、TA1535, TA1537及びWP2*uvrA*の検査日：2003年10月29日～10月31日)、試験施設の基準に適合しているコロニーを選択した(Attachment 1)。

菌株は、特性検査の結果から選択したコロニーを培養し、その菌懸濁液0.8 mLに対してDMSOを0.07 mLの割合で加えたものを、チューブ(2 mL容セラムチューブ、住友ベークライト株式会社)に200  $\mu$ Lずつ分注し、-80°C設定の冷凍庫[型式：BFV-130(LR)、エスペック株式会社]内に凍結保管した(TA100及びTA98の分注日：2004年3月23日、TA1535, TA1537及びWP2*uvrA*の分注日：2003年12月26日、使用期限：分注後2年以内)。

菌株の前培養には、OXOID NUTRIENT BROTH No.2(ロット番号：298714, OXOID LTD.)2.0 gに注射用水80 mLの割合で加えて高圧蒸気滅菌(121°C, 15分)した培養液を使用した。乾熱滅菌(180°C, 1時間、以下同様)したモルトン栓付のL字管(容量：約40 mL)に先の培養液を10 mL分注し、ここへ融解した菌液を20  $\mu$ L接種した。これを往復振盪型式(振盪数：90回/分、振幅：4 cm)の振盪器(型式：M-100<sup>N</sup>、タイテック株式会社)を用いて、37°Cで9時間振盪培養した。

培養終了後、菌懸濁液の濁度を分光光度計(型式：NovaspecII, アマシャム バイオサイエンス株式会社)を用いて測定し、そのO.D.値から生菌数を求めた(Attachment 2)。また、菌懸濁液は使用時まで室温で保管した。なお、実験操作は空調管理されたAmes試験室(A棟)にて行った。

### 4. S9 mix

S9は、Attachment 3の条件により2004年10月1日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの(ロット番号：04100107)を使用した。S9は、2004年11月2日に購入し、使用時まで-80°C設定の冷凍庫[型式：BFV-130(LR)、エスペック株式会社]内に凍結保管した。

S9 mixは、S9 mix用のCofactor(商品名：Cofactor-I, ロット番号：999402, オリエンタル酵母工業株式会社)を注射用水で溶解し、メンブランフィルター( $\phi$ 0.2  $\mu$ m, Nalge)で濾過した後、使用直前にS9を加えて調製した。S9 mixの組成をAttachment 4に示した。

## 5. 培地

最少グルコース寒天平板培地は、テスメディアAN培地(ロット番号：ANI990KT, 製造日：2004年11月16日, オリエンタル酵母工業株式会社)を使用した。テスメディアAN培地の組成をAttachment 5に示した。

トップアガーは、注射用水にBacto Agar(ロット番号：2120028, DIFCO)が0.6%, 塩化ナトリウムが0.5%の割合になるように加えて高圧蒸気滅菌(121 °C, 20分, 以下同様)した。この水溶液に*S. typhimurium*の場合には0.5 mmol/L L-ヒスチジンと0.5 mmol/L D-ビオチンを混合した水溶液を、*E. coli*の場合には0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を、それぞれ容量比10：1の割合で加えて調製した。なお、各アミノ酸溶液はフィルターシステム( $\phi$ 0.22  $\mu$ m, CORNING)で濾過したものを使用した。

## 6. 無菌試験

被験物質の最高濃度液及びS9 mixの無菌試験は、用量設定試験、本試験(I)及び本試験(II)実施の際に、それぞれ2枚のプレートを用いて実施した。

試験は、被験物質の最高濃度液0.1 mL又はS9 mix 0.5 mLに、45 °Cに保温したトップアガー2 mLを加えて最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ、プレートを転倒して37 °C設定の恒温器(型式：IA-81, ヤマト科学株式会社)内で約48時間培養した後、コロニーの出現を調べた。被験物質の最高濃度液の無菌試験には、用量設定試験、本試験(I)及び本試験(II)とも50 mg/mL濃度液を用いた。

## 7. 試験方法

### 7.1. 試験操作

試験条件をAttachment 6に示した。

試験は、ブレインキュベーション法により、代謝活性化によらない場合(S9 mix無添加)と代謝活性化による場合(S9 mix添加)で行った。すなわち、乾熱滅菌した試験管(15.5×100 mm, 清浄試験管ラルボ, テルモ株式会社)に、①検体液0.1 mL, ②高圧蒸気滅菌した0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5 mL(代謝活性化によらない場合)又はS9 mix 0.5 mL(代謝活性化による場合), ③菌懸濁液0.1 mLの順に加え、往復振盪型式の振盪器を用いて37 °Cで20分間インキュベーションした。その後、45 °Cに保温したトップアガーを2 mL加えて混合した後、最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ、プレートを転倒して37 °C設定の恒温器内で約48時間培養した。

培養終了後、プレート上での析出物の有無を肉眼で観察した後、復帰変異コロニー数を、コロニーアナライザー(CA-11D, システムサイエンス株式会社)により計測し、その後、菌の生育阻害の有無を100倍の顕微鏡下で観察した。プレート上での析出物の有無は、培養開始時にも肉眼で観察した。

プレートは、菌株、代謝活性化の有無及び濃度の組み合わせごとに用量設定試験では1枚、本試験(I)及び本試験(II)では各3枚使用した。また、試験管及びプレートは、菌株ごとに油性インクで色分けすることで識別した。



## 7.2. 用量設定試験

用量設定試験の試験濃度は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日)に従い、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株も5000 µg/plateを最高濃度として、以下公比4で1250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22及び0.305 µg/plateの計8濃度を設定した。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

## 7.3. 本試験(I)及び本試験(II)

用量設定試験の結果から本試験(I)及び本試験(II)の濃度は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、菌の生育阻害を示さないと考えられる濃度が4濃度以上含まれるように、以下公比2で6濃度を設定した。すなわち、S9 mix無添加の場合、TA100及びTA1535では9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 µg/plate, WP2uvrAでは156.3, 312.5, 625, 1250, 2500及び5000 µg/plate, TA98及びTA1537では2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1及び78.1 µg/plateとした。S9 mix添加の場合、TA100では39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625及び1250 µg/plate, TA1535及びWP2uvrAでは156.3, 312.5, 625, 1250, 2500及び5000 µg/plate, TA98では9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 µg/plate, TA1537では2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1及び78.1 µg/plateとした。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

## 8. 試験の成立条件

無菌試験で被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入がなく、陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数が試験施設のバックグラウンドデータ(Attachment 7)の範囲内にあり、さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験が成立するものとした。

## 9. 統計学的方法

復帰変異コロニー数は、濃度ごとに平均値と標準偏差を算出した。なお、下記の判定基準に従ったため、有意差検定は実施しなかった。

## 10. 判定基準

試験の結果は、被験物質を処理したプレートにおける復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上の値を示し、更に濃度に依存して増加した場合を陽性とした。

## 試験成績

## 1. 用量設定試験 (Table 1 及び Figure 1-1~1-2)

## 1.1. プレート上の析出物

プレート上の析出物は、S9 mix無添加の場合、培養開始時及び培養終了時に1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において透明な油状の析出物が認められた。S9 mix添加の場合、培養開始時には1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において白色の油膜状の析出物が、培養終了時には最高濃度の5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ において白色の微細な析出物が認められた。

## 1.2. 菌の生育阻害

菌の生育阻害は、S9 mix 無添加の場合、TA100 及び TA1535 では 312.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の濃度において、WP2*uvrA* では最高濃度の 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  において、TA98 及び TA1537 では 78.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の濃度において認められた。S9 mix 添加の場合、TA100 では 1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の濃度において、TA1535 及び WP2*uvrA* では最高濃度の 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  において、TA98 では 312.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の濃度において、TA1537 では 78.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の濃度において認められた。

## 1.3. 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても陰性対照の2倍未満であった。

## 1.4. 無菌試験

無菌試験では、被験物質の最高濃度液 (50 mg/mL) 及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

## 1.5. 陰性対照及び陽性対照

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。又、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。

## 2. 本試験(I) (Table 2-1~2-2及びFigure 2-1~2-2)及び本試験(II) (Table 3-1~3-2及びFigure 3-1~3-2)

## 2.1. プレート上の析出物

プレート上の析出物は、S9 mix無添加の場合、培養開始時には625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、培養終了時には1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において透明な油状の析出物が認められた。S9 mix添加の場合、培養開始時には1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において白色の油膜状の析出物が、培養終了時には2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において白色の微細な析出物が認められた。

## 2.2. 菌の生育阻害

菌の生育阻害は、S9 mix 無添加の場合、TA100 及び TA1535 では 156.3  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の濃度において、WP2*uvrA* では最高濃度の 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  において、TA98 及び TA1537 では 39.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の濃度において認められた。S9 mix 添加の場合、TA100 では 625  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の濃度において、TA1535 では 2500  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の濃度において、WP2*uvrA* では最高濃度の 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  において、TA98 では最高濃度の 312.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  において、TA1537 では最高濃度の 78.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  において認められた。

## 2.3. 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても陰性対照の2倍未満であった。

## 2.4. 無菌試験

無菌試験では、被験物質の最高濃度液(50 mg/mL)及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

## 2.5. 陰性対照及び陽性対照

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。又、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。

## 考 察

2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンの遺伝子突然変異誘発性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した。

2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンは、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株のすべての濃度において、復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以上に増加しなかった。

各試験における無菌試験では、被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

各試験における陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。

本試験(I)及び本試験(II)には再現性が認められた。

以上の結果、当試験の条件下において、2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。なお、2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンは当試験施設で同時期に実施した哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性の結果が得られている<sup>2)</sup>。また、関連物質の $\alpha$ -メチルスチレンでは復帰変異試験、染色体異常試験において陰性、姉妹染色分体交換試験において陽性との報告がある<sup>3)</sup>。

#### 文 献

- 1) 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，平成3年3月
- 2) 三輪芳久ら：2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンの哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験（試験番号：971024），株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所（2006）。
- 3) （財）化学物質評価研究機構：化学物質安全性（ハザード）評価シート（2001）。

Table 1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in bacteria (dose-finding test)

With(+) or without(-) S9 mix	Compound concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	111	10	51	19	13
	0.305	136	17	48	17	3
	1.22	146	8	46	9	6
	4.88	125	16	35	17	9
	19.5	118	13	47	20	13
	78.1	137	17	44	13*	14*
	312.5	114*	10*	33	22*	8*
	1250#	126*	13*	49	16*	7*
S9 mix (+)	5000#	125*	16*	48*	22*	6*
	Negative control	146	9	41	29	20
	0.305	137	16	36	26	15
	1.22	138	16	44	31	18
	4.88	154	14	49	32	19
	19.5	127	11	46	29	21
	78.1	137	17	40	28	19*
	312.5	139	7	42	17*	20*
	1250	123*	12	44	35*	10*
5000##	137*	12*	36*	27*	4*	
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	531	628	157	485	571
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA				
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	957	312	843	352	187

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide; NaN<sub>3</sub> : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride;

2AA : 2-aminoanthracene.

\* : Bacterial growth inhibition was observed.

# : Clear oily precipitations were observed on the surface of agar plate.

## : White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 2-1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test I : -S9 mix)

Compound concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Negative control	117, 118, 143 (126 $\pm$ 14.7)	12, 17, 19 (16 $\pm$ 3.6)	43, 45, 46 (45 $\pm$ 1.5)	13, 19, 22 (18 $\pm$ 4.6)	13, 14, 20 (16 $\pm$ 3.8)
2.44	/	/	/	16, 21, 27 (21 $\pm$ 5.5)	17, 19, 24 (20 $\pm$ 3.6)
4.88	/	/	/	20, 25, 28 (24 $\pm$ 4.0)	19, 25, 28 (24 $\pm$ 4.6)
9.77	97, 104, 111 (104 $\pm$ 7.0)	15, 18, 24 (19 $\pm$ 4.6)	/	16, 20, 20 (19 $\pm$ 2.3)	16, 20, 23 (20 $\pm$ 3.5)
19.5	114, 116, 130 (120 $\pm$ 8.7)	20, 20, 25 (22 $\pm$ 2.9)	/	17, 19, 19 (18 $\pm$ 1.2)	18, 20, 29 (22 $\pm$ 5.9)
39.1	100, 100, 103 (101 $\pm$ 1.7)	13, 13, 17 (14 $\pm$ 2.3)	/	20*, 21*, 21* (21 $\pm$ 0.6)	21*, 22*, 23* (22 $\pm$ 1.0)
78.1	97, 105, 118 (107 $\pm$ 10.6)	12, 14, 18 (15 $\pm$ 3.1)	/	15*, 19*, 27* (20 $\pm$ 6.1)	15*, 17*, 24* (19 $\pm$ 4.7)
156.3	88*, 101*, 104* (98 $\pm$ 8.5)	11*, 16*, 19* (15 $\pm$ 4.0)	44, 50, 60 (51 $\pm$ 8.1)	/	/
312.5	90*, 109*, 109* (103 $\pm$ 11.0)	15*, 16*, 17* (16 $\pm$ 1.0)	39, 47, 51 (46 $\pm$ 6.1)	/	/
625	/	/	37, 51, 54 (47 $\pm$ 9.1)	/	/
1250#	/	/	54, 58, 67 (60 $\pm$ 6.7)	/	/
2500#	/	/	38, 41, 44 (41 $\pm$ 3.0)	/	/
5000#	/	/	46*, 55*, 61* (54 $\pm$ 7.5)	/	/
<b>Positive control</b>					
Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9AA
Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
Number of colonies/plate	470, 544, 548 (521 $\pm$ 43.9)	578, 604, 614 (599 $\pm$ 18.6)	165, 168, 171 (168 $\pm$ 3.0)	401, 425, 441 (422 $\pm$ 20.1)	339, 393, 481 (404 $\pm$ 71.7)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN<sub>3</sub> : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride.

( ) : Mean  $\pm$  S.D.

\* : Bacterial growth inhibition was observed.

# : Clear oily precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 2-2. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test I : +S9 mix)

Compound concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Negative control	123, 130, 145 (133 $\pm$ 11.2)	16, 17, 19 (17 $\pm$ 1.5)	34, 42, 60 (45 $\pm$ 13.3)	29, 36, 41 (35 $\pm$ 6.0)	20, 21, 21 (21 $\pm$ 0.6)
2.44	/	/	/	/	21, 33, 36 (30 $\pm$ 7.9)
4.88	/	/	/	/	28, 33, 38 (33 $\pm$ 5.0)
9.77	/	/	/	25, 37, 44 (35 $\pm$ 9.6)	24, 29, 32 (28 $\pm$ 4.0)
19.5	/	/	/	22, 26, 27 (25 $\pm$ 2.6)	24, 30, 32 (29 $\pm$ 4.2)
39.1	108, 126, 131 (122 $\pm$ 12.1)	/	/	36, 36, 42 (38 $\pm$ 3.5)	25, 26, 29 (27 $\pm$ 2.1)
78.1	122, 123, 128 (124 $\pm$ 3.2)	/	/	35, 36, 41 (37 $\pm$ 3.2)	30*, 32*, 33* (32 $\pm$ 1.5)
156.3	118, 124, 124 (122 $\pm$ 3.5)	13, 18, 20 (17 $\pm$ 3.6)	43, 51, 53 (49 $\pm$ 5.3)	29, 30, 41 (33 $\pm$ 6.7)	/
312.5	101, 111, 114 (109 $\pm$ 6.8)	9, 10, 14 (11 $\pm$ 2.6)	41, 46, 51 (46 $\pm$ 5.0)	19*, 26*, 35* (27 $\pm$ 8.0)	/
625	98*, 101*, 114* (104 $\pm$ 8.5)	18, 18, 21 (19 $\pm$ 1.7)	28, 37, 58 (41 $\pm$ 15.4)	/	/
1250	82*, 86*, 97* (88 $\pm$ 7.8)	7, 13, 18 (13 $\pm$ 5.5)	42, 45, 54 (47 $\pm$ 6.2)	/	/
2500##	/	14*, 22*, 27* (21 $\pm$ 6.6)	51, 56, 57 (55 $\pm$ 3.2)	/	/
5000##	/	15*, 17*, 19* (17 $\pm$ 2.0)	42*, 53*, 69* (55 $\pm$ 13.6)	/	/
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	748, 777, 835 (787 $\pm$ 44.3)	303, 330, 367 (333 $\pm$ 32.1)	746, 759, 924 (810 $\pm$ 99.2)	364, 381, 385 (377 $\pm$ 11.2)	134, 142, 165 (147 $\pm$ 16.1)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

( ) : Mean  $\pm$  S.D.

\* : Bacterial growth inhibition was observed.

## : White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 3-1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test II : -S9 mix)

Compound concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
Negative control	119 , 119 , 124 (121 $\pm$ 2.9)	11 , 12 , 13 (12 $\pm$ 1.0)	42 , 49 , 54 (48 $\pm$ 6.0)	20 , 21 , 21 (21 $\pm$ 0.6)	10 , 16 , 19 (15 $\pm$ 4.6)
2.44	/	/	/	12 , 18 , 19 (16 $\pm$ 3.8)	20 , 22 , 25 (22 $\pm$ 2.5)
4.88	/	/	/	17 , 23 , 30 (23 $\pm$ 6.5)	25 , 26 , 28 (26 $\pm$ 1.5)
9.77	106 , 114 , 120 (113 $\pm$ 7.0)	14 , 16 , 19 (16 $\pm$ 2.5)	/	19 , 21 , 24 (21 $\pm$ 2.5)	18 , 20 , 24 (21 $\pm$ 3.1)
19.5	126 , 127 , 130 (128 $\pm$ 2.1)	13 , 13 , 16 (14 $\pm$ 1.7)	/	16 , 22 , 25 (21 $\pm$ 4.6)	17 , 21 , 21 (20 $\pm$ 2.3)
39.1	118 , 136 , 137 (130 $\pm$ 10.7)	12 , 14 , 19 (15 $\pm$ 3.6)	/	20* , 22* , 25* (22 $\pm$ 2.5)	20* , 21* , 27* (22 $\pm$ 3.8)
78.1	118 , 120 , 122 (120 $\pm$ 2.0)	10 , 14 , 17 (14 $\pm$ 3.5)	/	18* , 21* , 25* (21 $\pm$ 3.5)	20* , 23* , 27* (23 $\pm$ 3.5)
156.3	119* , 128* , 134* (127 $\pm$ 7.5)	11* , 12* , 15* (13 $\pm$ 2.1)	50 , 61 , 63 (58 $\pm$ 7.0)	/	/
312.5	97* , 109* , 118* (108 $\pm$ 10.5)	9* , 11* , 12* (11 $\pm$ 1.5)	47 , 55 , 57 (53 $\pm$ 5.3)	/	/
625	/	/	51 , 63 , 63 (59 $\pm$ 6.9)	/	/
1250#	/	/	53 , 64 , 72 (63 $\pm$ 9.5)	/	/
2500#	/	/	62 , 69 , 76 (69 $\pm$ 7.0)	/	/
5000#	/	/	56* , 58* , 62* (59 $\pm$ 3.1)	/	/
<b>Positive control</b>					
Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9AA
Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
Number of colonies/plate	539 , 549 , 595 (561 $\pm$ 29.9)	588 , 604 , 621 (604 $\pm$ 16.5)	153 , 169 , 174 (165 $\pm$ 11.0)	377 , 387 , 459 (408 $\pm$ 44.7)	377 , 435 , 482 (431 $\pm$ 52.6)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN<sub>3</sub> : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride.

( ) : Mean  $\pm$  S.D.

\* : Bacterial growth inhibition was observed.

# : Clear oily precipitations were observed on the surface of agar plate.



Table 3-2. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in bacteria (mutagenicity test II : +S9 mix)

Compound concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
Negative control	107, 116, 140 (121 $\pm$ 17.1)	10, 12, 13 (12 $\pm$ 1.5)	48, 50, 52 (50 $\pm$ 2.0)	30, 37, 38 (35 $\pm$ 4.4)	20, 20, 27 (22 $\pm$ 4.0)
2.44	/	/	/	/	26, 31, 32 (30 $\pm$ 3.2)
4.88	/	/	/	/	23, 33, 35 (30 $\pm$ 6.4)
9.77	/	/	/	29, 31, 32 (31 $\pm$ 1.5)	25, 30, 37 (31 $\pm$ 6.0)
19.5	/	/	/	28, 32, 37 (32 $\pm$ 4.5)	32, 34, 41 (36 $\pm$ 4.7)
39.1	144, 155, 164 (154 $\pm$ 10.0)	/	/	33, 35, 42 (37 $\pm$ 4.7)	25, 28, 36 (30 $\pm$ 5.7)
78.1	128, 151, 159 (146 $\pm$ 16.1)	/	/	35, 39, 39 (38 $\pm$ 2.3)	31*, 34*, 37* (34 $\pm$ 3.0)
156.3	115, 136, 141 (131 $\pm$ 13.8)	8, 12, 19 (13 $\pm$ 5.6)	47, 53, 61 (54 $\pm$ 7.0)	29, 38, 40 (36 $\pm$ 5.9)	/
312.5	123, 131, 142 (132 $\pm$ 9.5)	8, 10, 11 (10 $\pm$ 1.5)	60, 64, 67 (64 $\pm$ 3.5)	25*, 38*, 38* (34 $\pm$ 7.5)	/
625	109*, 137*, 151* (132 $\pm$ 21.4)	9, 10, 12 (10 $\pm$ 1.5)	50, 56, 60 (55 $\pm$ 5.0)	/	/
1250	116*, 124*, 137* (126 $\pm$ 10.6)	7, 9, 16 (11 $\pm$ 4.7)	45, 51, 61 (52 $\pm$ 8.1)	/	/
2500##	/	10*, 11*, 11* (11 $\pm$ 0.6)	34, 46, 47 (42 $\pm$ 7.2)	/	/
5000##	/	7*, 10*, 12* (10 $\pm$ 2.5)	48*, 56*, 59* (54 $\pm$ 5.7)	/	/
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	818, 903, 914 (878 $\pm$ 52.5)	297, 317, 338 (317 $\pm$ 20.5)	822, 832, 910 (855 $\pm$ 48.2)	375, 376, 399 (383 $\pm$ 13.6)	147, 153, 162 (154 $\pm$ 7.5)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

( ) : Mean  $\pm$  S.D.

\* : Bacterial growth inhibition was observed.

## : White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

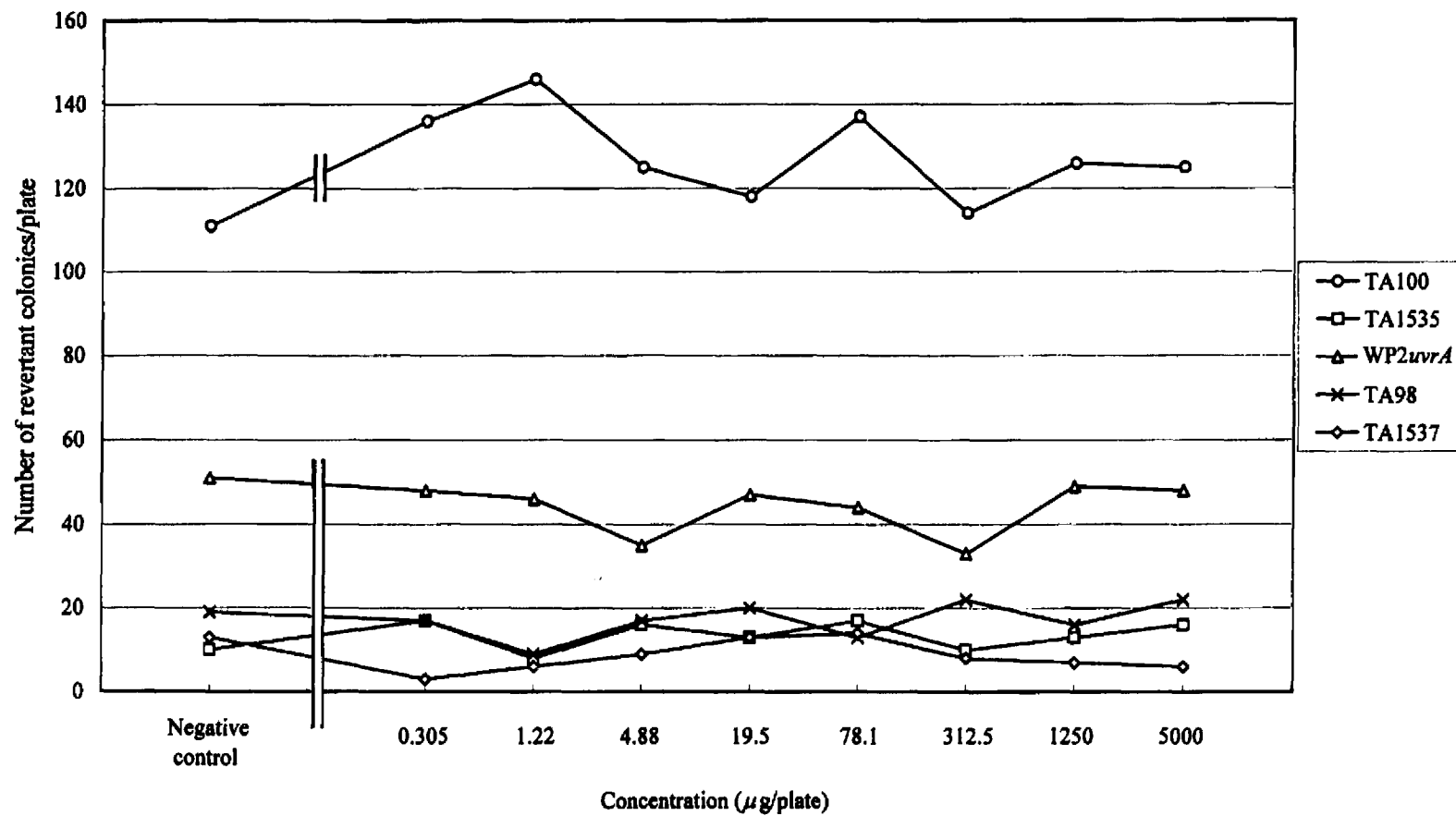


Figure 1-1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria (dose-finding test: -S9 mix).

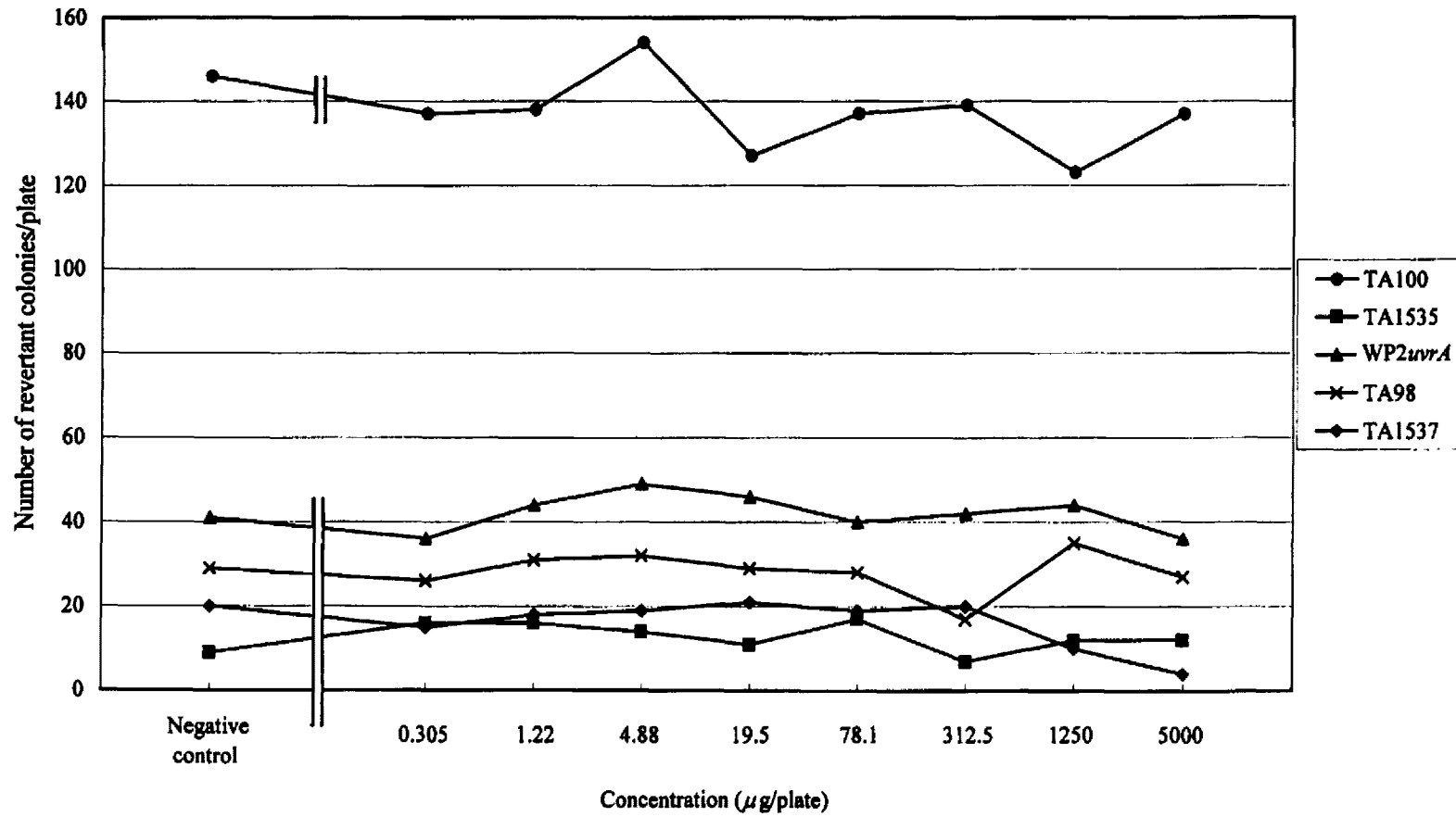


Figure 1-2. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria (dose-finding test: +S9 mix).

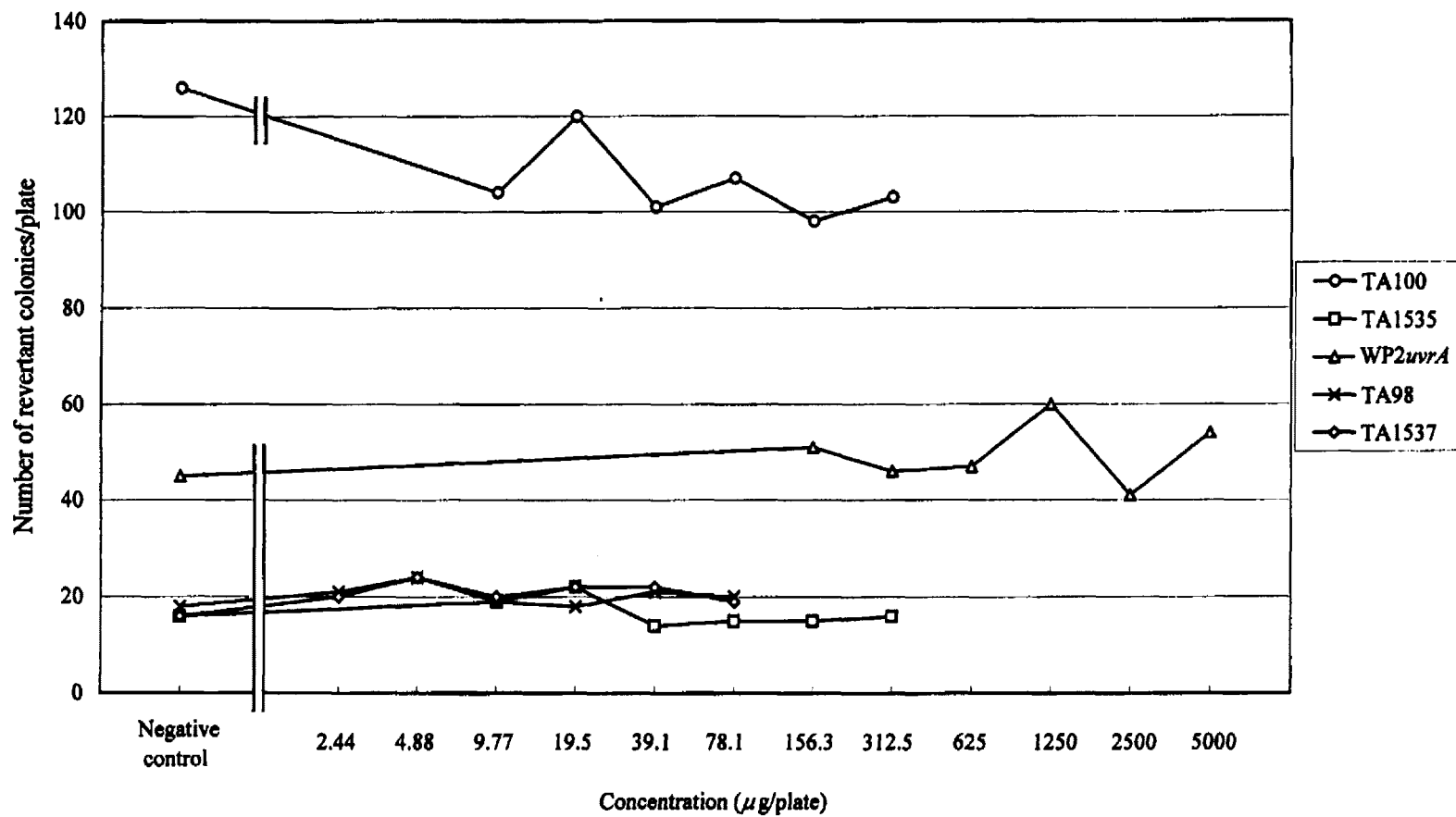


Figure 2-1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria (mutagenicity test I: -S9 mix).

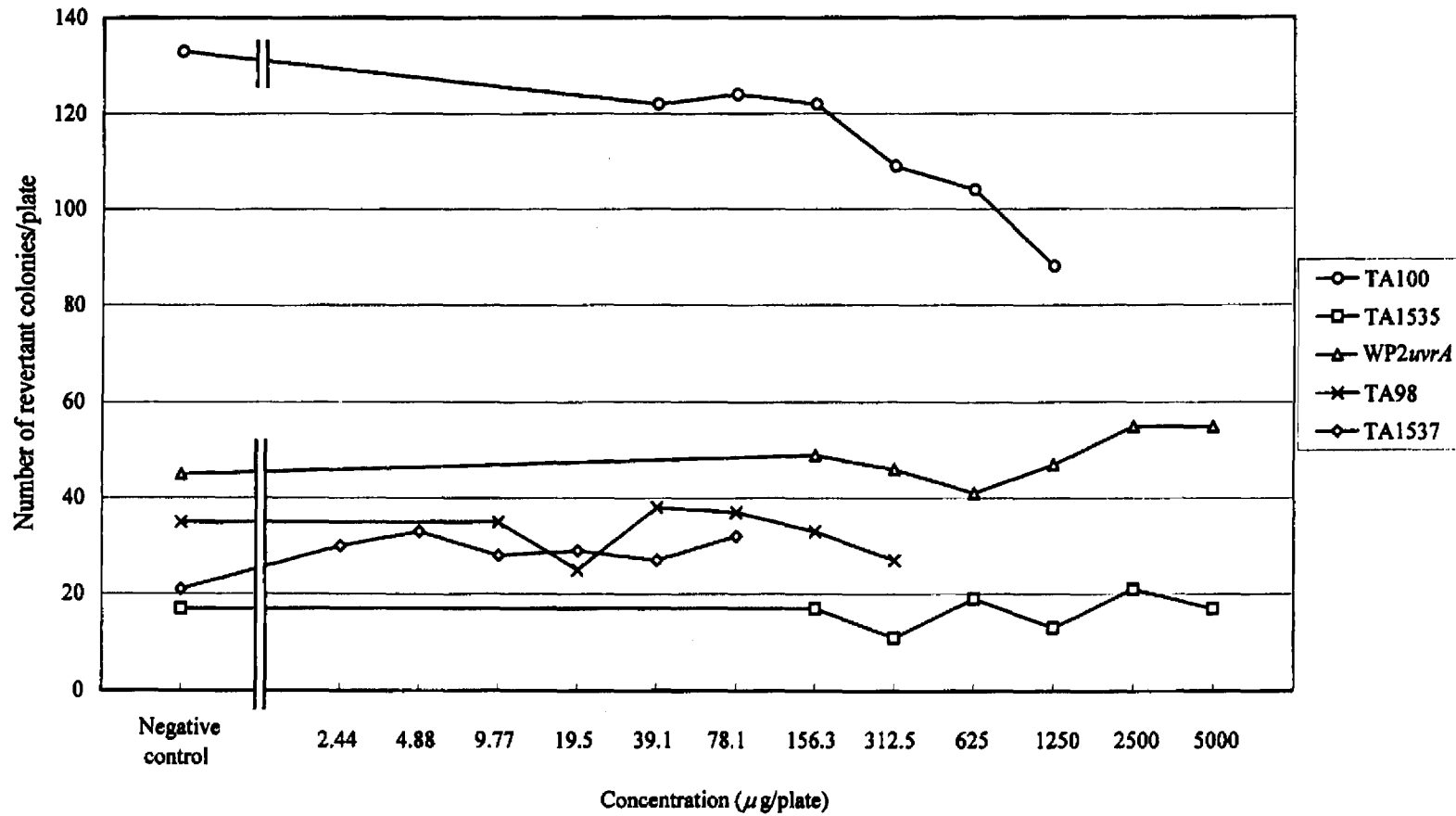


Figure 2-2. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria (mutagenicity test I: +S9 mix).

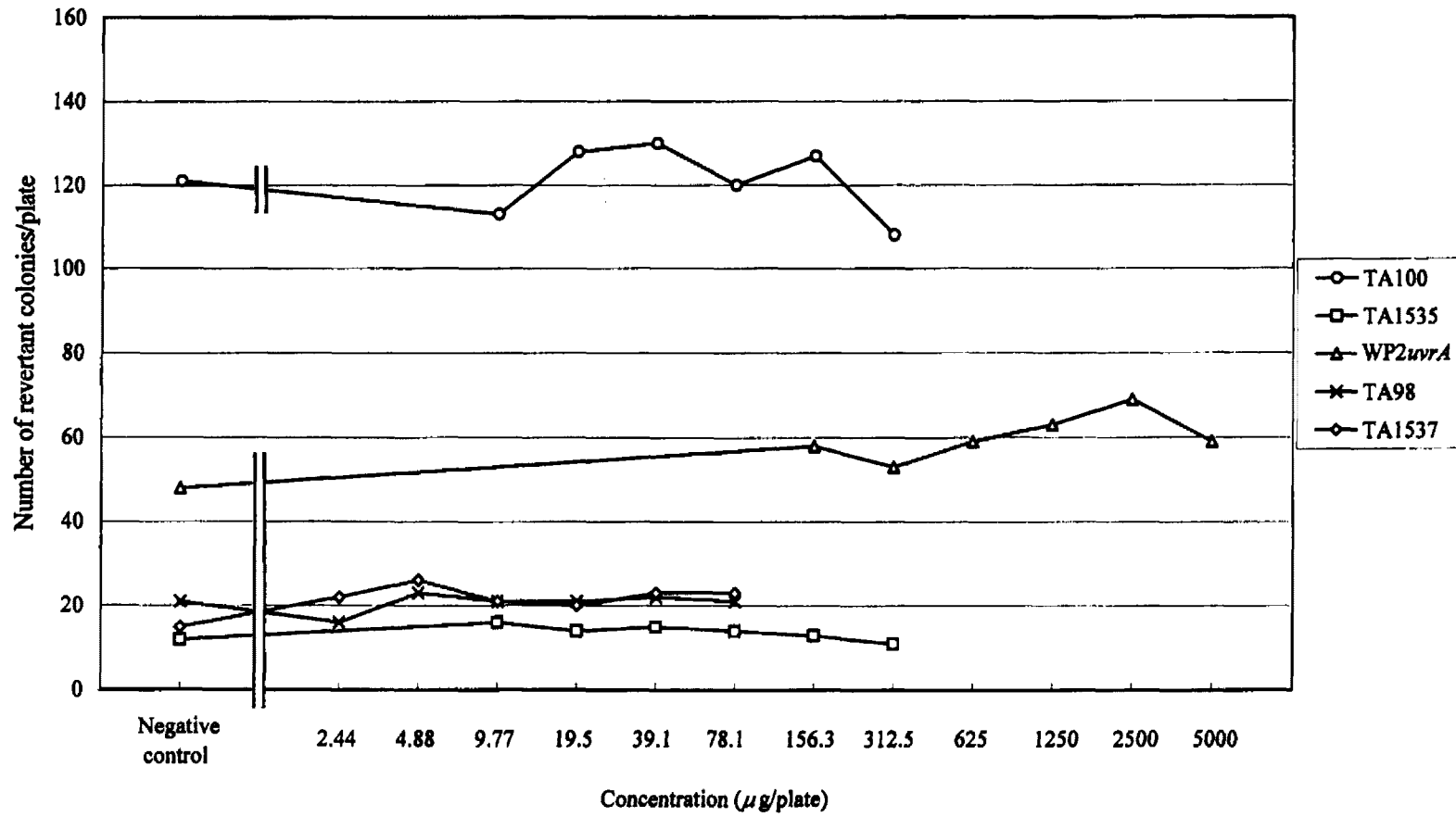


Figure 3-1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria (mutagenicity test II: -S9 mix).

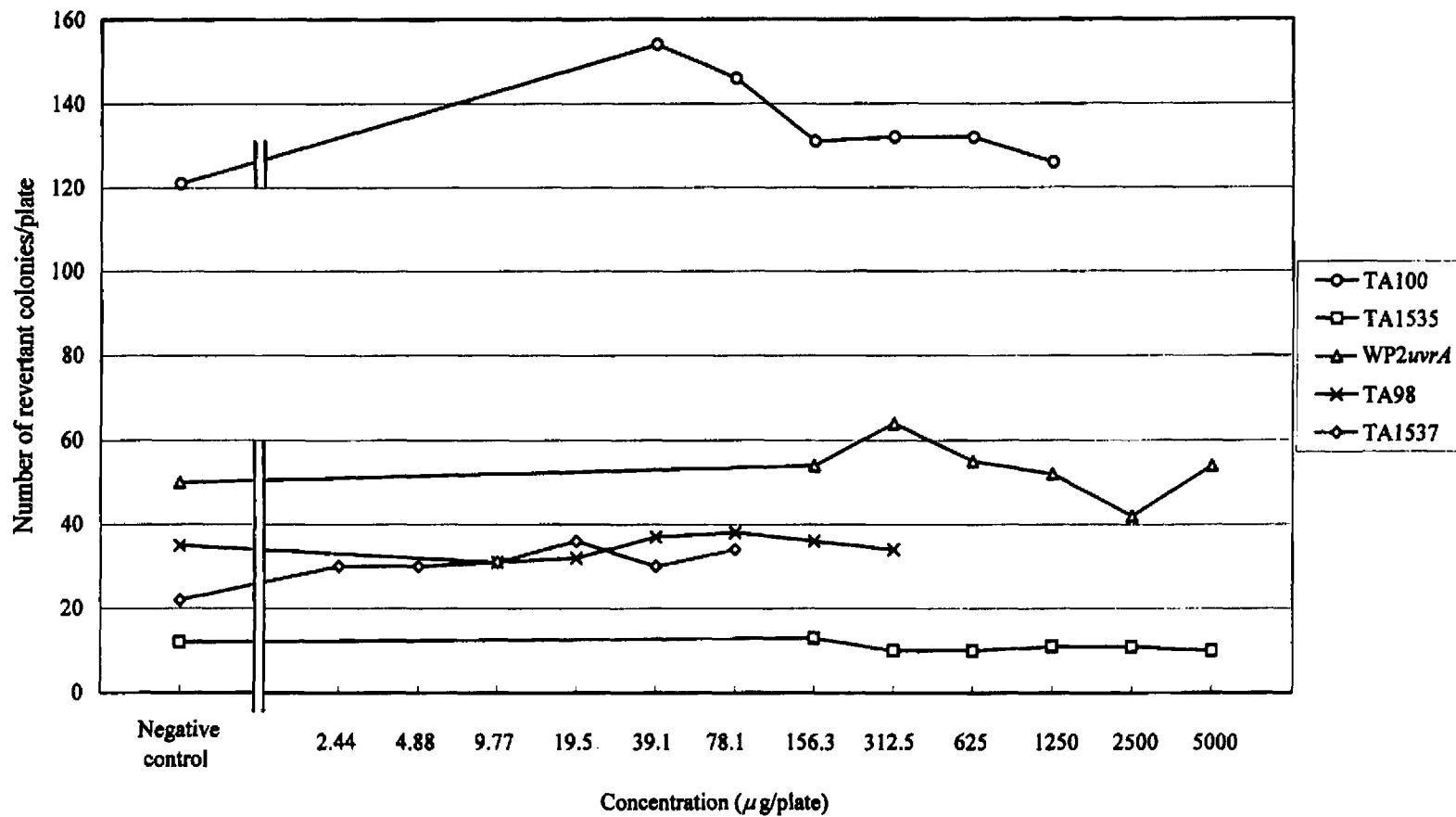


Figure 3-2. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix).