

# 最終報告書

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシドの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：4181（115-099）

平成12年7月13日

試験委託者  
厚生省 生活衛生局

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
2. 表題.....	4
3. 試験目的.....	4
11. 被験物質.....	6
12. 試験材料および方法.....	7
13. 試験結果.....	14
14. 考察および結論.....	15

Figures	F-1~5
Figure 1 Bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide in strain TA100	F-1
Figure 2 Bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide in strain TA1535	F-2
Figure 3 Bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide in strain WP2 <i>uvrA</i>	F-3
Figure 4 Bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide in strain TA98	F-4
Figure 5 Bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide in strain TA1537	F-5

Tables		T-1 ~4
Table 1	Results of the bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide (1st trial) [direct method : -S9]	T-1
Table 2	Results of the bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide (1st trial) [activation method : +S9]	T-2
Table 3	Results of the bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide (2nd trial) [direct method : -S9]	T-3
Table 4	Results of the bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide (2nd trial) [activation method : +S9]	T-4

## 1. 要約

本試験条件下において、N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド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。

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド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、N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド処理では 39.1~5000  $\mu\text{g}$ /プレート のいずれの試験用量においても、ラット肝マイクロソーム (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、直接法および代謝活性化法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。

2. 表題

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシドの細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討した。

11. 被験物質

11.1. 被験物質名

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド  
【N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide】

11.2. ロット番号

11.3. 純度

20.0 wt%

11.4. 保管条件

冷暗所

11.5. 別名

TMAH

11.6. CAS 番号

75-59-2

11.7. 構造式又は示性式

$(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$

11.8. 分子量

91.03

11.9. 常温における性状

水溶液（無色透明な液体）

11.10. 溶媒に対する溶解度等

水とは任意に溶解する。

11.11. 安定性

安定

11.12. 取り扱い上の注意

強アルカリ（pH 約 14）

11.13. 残余被験物質の処理

被験物質の残余は、染色体異常試験（試験番号：4182）終了後、被験物質提供元に返却する。

## 12. 試験材料および方法

### 12.1. 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 <i>uvrA</i> | (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日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受けた。

平成11年3月31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. K24605778 803)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-390AT; 三洋電機メデिकासシステム株式会社)に保存(-80℃)した。

### 12.2. 培地の調製

#### 12.2.1. 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11年3月16日製造, Lot No. AN180CO)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す。

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
精製水	200	mL
グルコース	20	g
精製水	100	mL
寒天 (No.1 ; Oxoid Limited ; Lot No. 802436)	15	g
精製水	700	mL

#### 12.2.2. トップアガー (軟寒天)

塩化ナトリウム 0.5% を含む 0.6% 寒天 (Bacto-agar : Difco Laboratories ; Lot No. 120535JD) 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. 412E1389) - 0.5 mmol/L D-ビオチン (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。

#### 12.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5% ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No.2 : Oxoid Limited ; Lot No. 028 59365) 培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液を 50  $\mu$ L 接種した。培養開始までの間冷却ユニット (ECS-1 : 東京理化工機株式会社) 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直ちに使用した。



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
本試験 1 回目	3.21	3.17	3.81	3.83	2.23
本試験 2 回目	3.74	3.50	3.71	3.87	2.27

#### 12.4. 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-400）を試験に使用した。

##### 12.4.1. 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。

- a. ロット番号 RAA-400
- b. 調製日 平成 11 年 3 月 25 日（誘導物質投与開始後 5 日目）
- c. 使用動物 ラット：Sprague-Dawley 系
- d. 性／週齢 雄／7 週齢
- e. 体重 187～232 g
- f. 臓器 肝臓
- g. 誘導物質 Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF)
- h. 投与量 PB：30 mg/kg 1 回（1 日目），  
および 60 mg/kg 3 回（2～4 日目）  
投与回数 BF：80 mg/kg 1 回（3 日目）
- i. 投与方法 腹腔内投与
- j. 蛋白含量 24.20 mg/mL

## 12.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す.

S9	0.1	mL
MgCl <sub>2</sub>	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

## 12.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水溶液であり、かつ、溶液中で安定であることから被験物質を注射用水 (株式会社 大塚製薬工場; Lot No. K8F80) を用いて希釈して調製原液とした。この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。ただし、原液中での被験物質濃度が 20.0 wt%であることを考慮して調製した。

## 12.6. 対照群

## 12.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒で試験した。

## 12.6.2. 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. K24605778 830) を用いて溶解し、500 あるいは 1000 μL ずつ小分けした後、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 98.0~102.0%; Lot No. PAN0050)

NaN<sub>3</sub> アジ化ナトリウム  
(和光純薬工業株式会社; 純度 99.0%以上; Lot No. TPR1596)

9-AA 9-アミノアクリジン塩酸塩  
(Aldrich Chemical Co., Inc.; 純度 98.0%; Lot No. AQ08326HN)

2-AA 2-アミノアントラセン  
(和光純薬工業株式会社; 純度 90.0%以上; Lot No. DLH6052)

## 《直接法》

a. AF-2	0.01	μg/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 <sub>3</sub>	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> )

## 《代謝活性化法》

a. 2-AA	1	μg/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。

## 12.6.3. 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 にトッパアガーをそれぞれ 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37℃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。

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

## 12.7. 復帰突然変異試験

## 12.7.1. 試験用量

1枚のプレートを用いて実施した予備的な試験の結果を以下に示す。

試験用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 Mix	復帰突然変異コロニー数				
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
0	-	107	11	26	22	4
19.5	-	109	11	21	17	4
78.1	-	107	8	24	25	2
313	-	112	5	10	16	6
1250	-	85*	4*	8*	4*	1*
0	+	106	13	19	27	10
19.5	+	101	11	20	20	12
78.1	+	103	12	16	26	7
313	+	99	7	18	23	7
1250	+	96*	2*	24	30*	10*

\*：生育阻害作用

直接法の全菌株ならびに代謝活性化法の大腸菌を除いた4菌株では1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ において菌株に対する生育阻害作用が観察された。復帰突然変異コロニー数については明確な増加傾向は認められなかった。本結果を基に、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用量(公比2)を設定した。

復帰突然変異試験で用量当たり3枚のプレートを用いた。

試験系	最高用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )				
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
直接法	1250	1250	1250	1250	1250
代謝活性化法	1250	1250	5000	1250	1250

#### 12.7.2. 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  $\mu$ L、次いで直接法の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500  $\mu$ L、代謝活性化法の場合、S9 mix を 500  $\mu$ L 分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100  $\mu$ L を加えた後、振盪恒温器 (M-100<sup>N</sup>: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、トッパガーを 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。

再現性を確認するため、本試験を独立して 2 回実施した。

#### 12.7.3. 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。さらに被験物質の沈殿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。

#### 12.8. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ 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。

### 13. 試験結果

#### 13.1. 試験結果 (1回目)

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した.

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド処理群の場合, 直接法, 代謝活性化法とも高用量群において試験菌株に対する生育阻害作用が観察された.

しかしながら, 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陰性対照と同等の値であり, 明確な増加傾向は認められなかった.

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.

なお, コロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

#### 13.2. 試験結果 (2回目)

試験結果を Figure 1~5, および Table 3, 4 に示した.

被験物質処理群の場合, 直接法, 代謝活性化法とも高用量群において試験菌株に対する生育阻害作用が観察されたが, 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.

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.

なお, コロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

以上, 2回繰り返し実施した本試験において, 直接法および代謝活性化法の両試験系とも再現性が確認された.

#### 14. 考察および結論

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシドの変異原性，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。

最高用量として試験菌株の生育を阻害する用量まで検討した。その結果，N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド処理群では直接法および代謝活性化法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，類縁体である Tetramethylammonium bromide, Tetramethylammonium chloride, Tetramethylammonium iodide, Tetramethylammonium fluoride tetrahydrate, Tetramethylammonium hexafluorophosphate, Tetramethylammonium hydroxide pentahydrate および Tetramethylammonium tetrafluoroborate 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いずれも当施設での背景データの範囲内であり，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 N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド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。

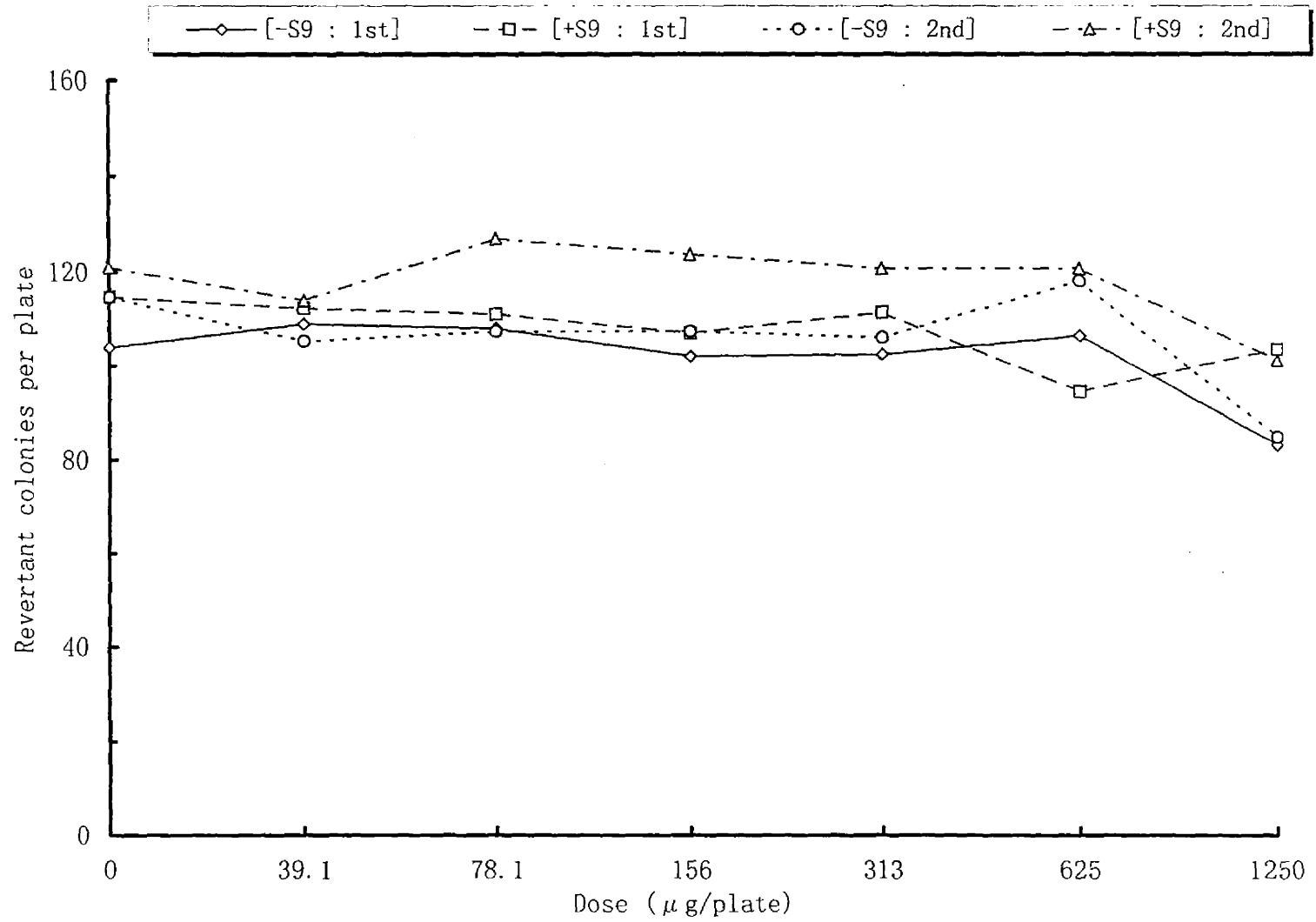


Figure 1. Bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide in strain TA100



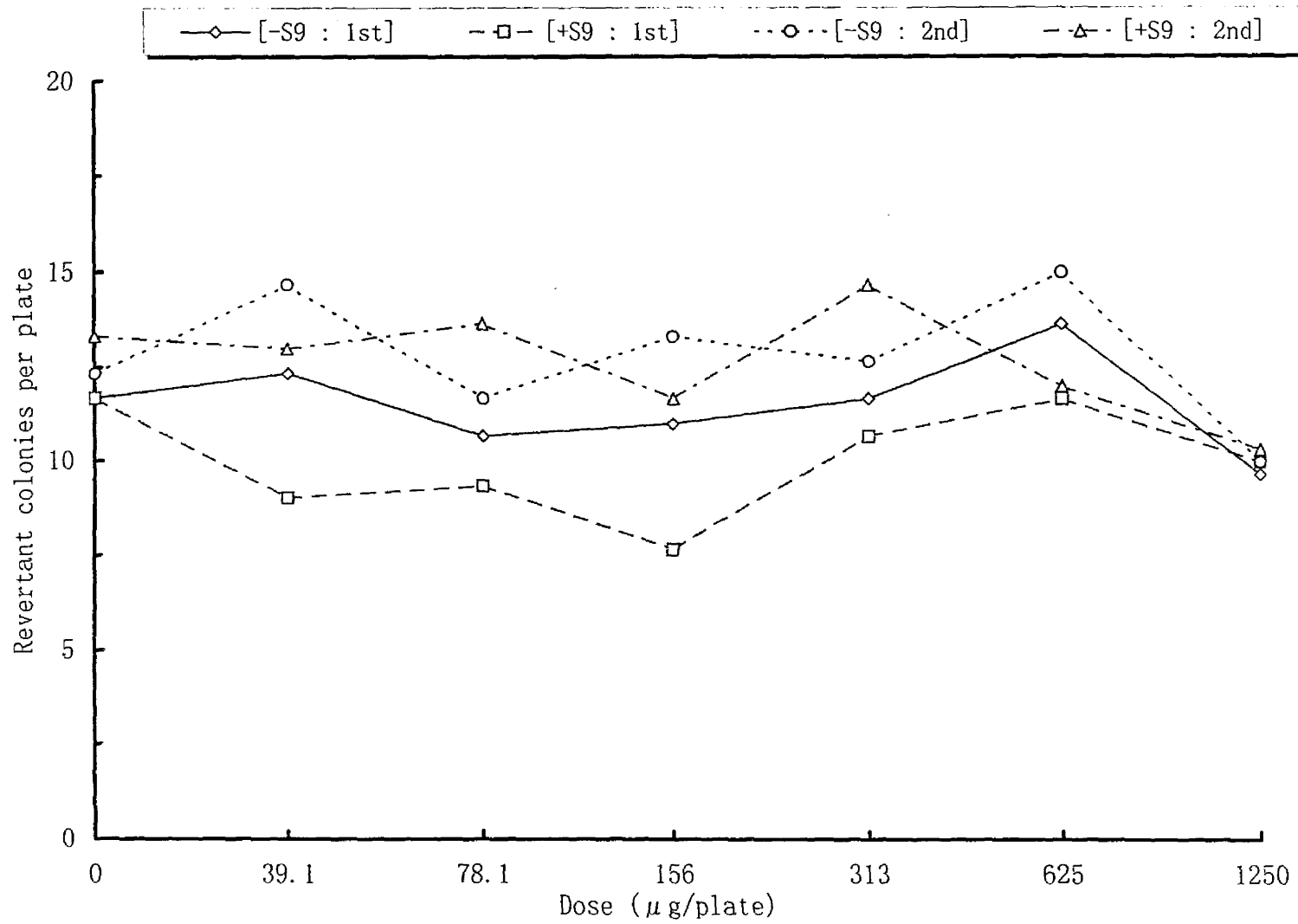


Figure 2. Bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide in strain TA1535

F-3

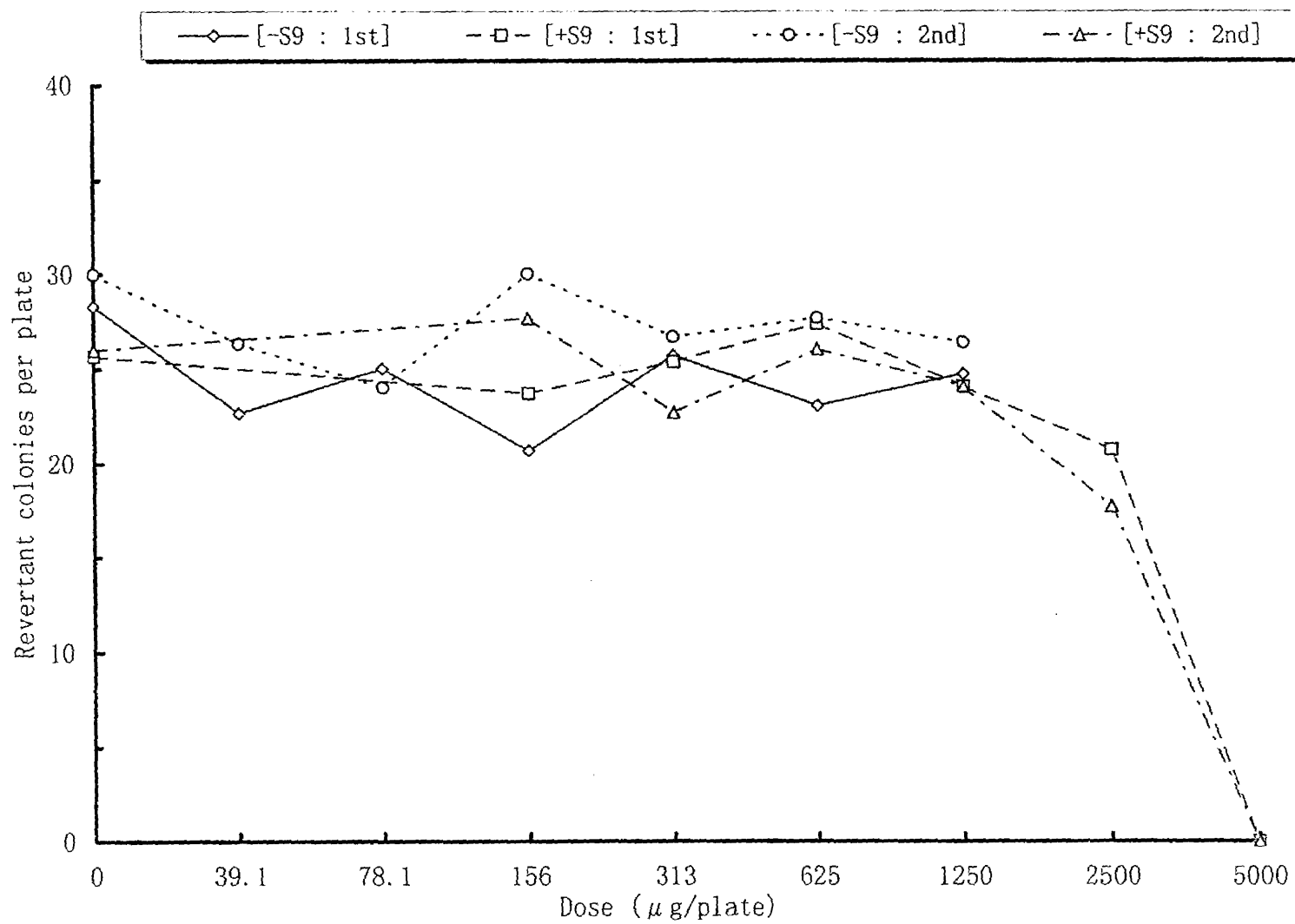


Figure 3. Bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide in strain WP2uvrA

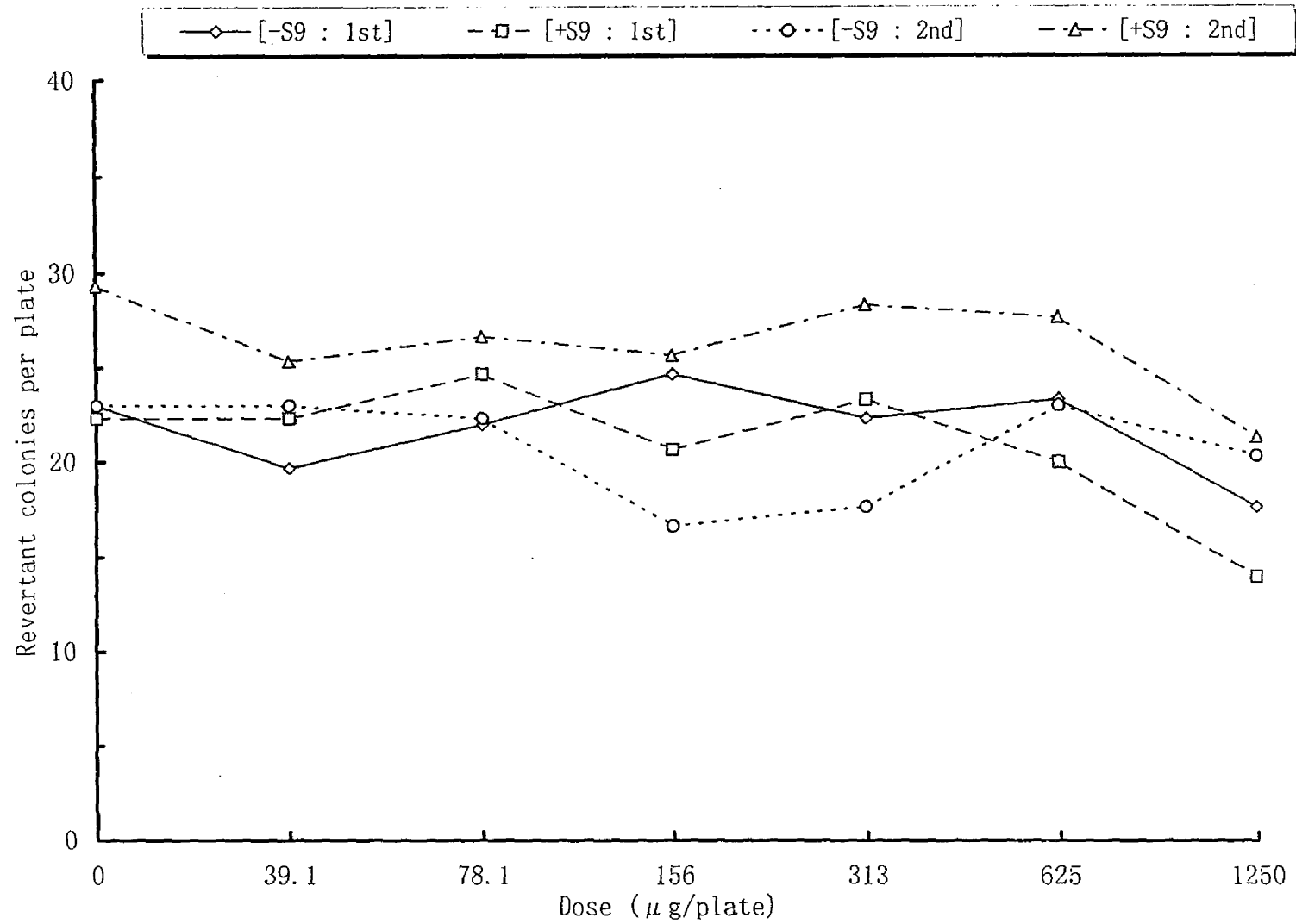


Figure 4. Bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide in strain TA98

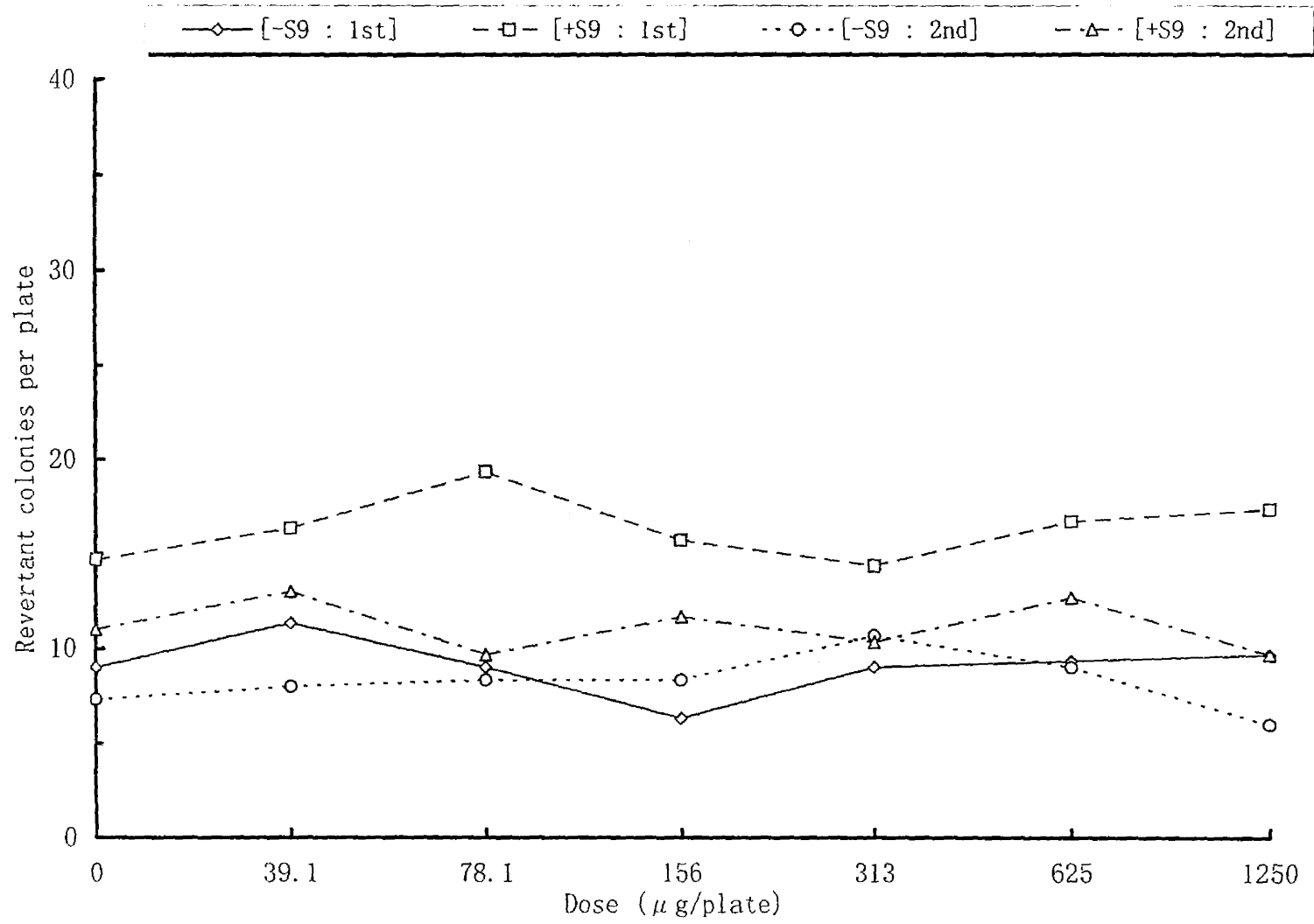


Figure 5. Bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide in strain TA1537

Table 1. Results of the bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide (1st trial)  
[direct method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu$ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	101	107	104	9	14	12	29	27	29	23	23	23	8	10	9
		[104 $\pm$	3]	[12 $\pm$	3]	[28 $\pm$	1]	[23 $\pm$	0]	[9 $\pm$	1]					
	39.1	118	104	105	11	11	15	18	25	25	17	20	22	11	10	13
		[109 $\pm$	8]	[12 $\pm$	2]	[23 $\pm$	4]	[20 $\pm$	3]	[11 $\pm$	2]					
	78.1	107	106	111	11	8	13	28	21	26	22	25	19	9	10	8
		[108 $\pm$	3]	[11 $\pm$	3]	[25 $\pm$	4]	[22 $\pm$	3]	[9 $\pm$	1]					
	156	102	104	100	12	9	12	20	20	22	28	26	20	6	7	6
	[102 $\pm$	2]	[11 $\pm$	2]	[21 $\pm$	1]	[25 $\pm$	4]	[6 $\pm$	1]						
313	97	102	108	11	11	13	22	26	29	23	23	21	8	9	10	
	[102 $\pm$	6]	[12 $\pm$	1]	[26 $\pm$	4]	[22 $\pm$	1]	[9 $\pm$	1]						
625	103	109	107	15	10	16	21	23	25	21	22	27	11	11	6	
	[106 $\pm$	3]	[14 $\pm$	3]	[23 $\pm$	2]	[23 $\pm$	3]	[9 $\pm$	3]						
1250	87 *	72 *	90 *	10 *	8 *	11 *	25 *	27 *	22 *	17 *	19 *	17 *	12 *	8 *	9 *	
	[83 $\pm$	10]	[10 $\pm$	2]	[25 $\pm$	3]	[18 $\pm$	1]	[10 $\pm$	2]						
Positive control	384	403	427 <sup>a)</sup>	356	379	382 <sup>b)</sup>	133	125	129 <sup>c)</sup>	589	560	598 <sup>c)</sup>	481	514	492 <sup>d)</sup>	
	[405 $\pm$	22]	[372 $\pm$	14]	[129 $\pm$	4]	[582 $\pm$	20]	[496 $\pm$	17]						

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu$ g/plate    b): NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5  $\mu$ g/plate

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

\* : Growth inhibition was observed

Table 2. Results of the bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide (1st trial)  
[activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu$ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	113	118	113	11	16	8	27	21	29	21	25	21	15	17	12
		[115 $\pm$ 3]		[12 $\pm$ 4]		[26 $\pm$ 4]		[22 $\pm$ 2]		[15 $\pm$ 3]						
	39.1	111	119	107	9	9	9				19	25	23	17	17	15
		[112 $\pm$ 6]		[9 $\pm$ 0]					[22 $\pm$ 3]		[16 $\pm$ 1]					
	78.1	115	110	108	11	8	9				23	26	25	19	21	18
		[111 $\pm$ 4]		[9 $\pm$ 2]					[25 $\pm$ 2]		[19 $\pm$ 2]					
	156	107	112	102	8	9	6	22	25	24	22	20	20	17	16	14
		[107 $\pm$ 5]		[8 $\pm$ 2]				[24 $\pm$ 2]		[21 $\pm$ 1]		[16 $\pm$ 2]				
	313	103	115	116	13	10	9	28	24	24	21	28	21	13	15	15
	[111 $\pm$ 7]		[11 $\pm$ 2]				[25 $\pm$ 2]		[23 $\pm$ 4]		[14 $\pm$ 1]					
625	94	96	93	16	9	10	29	27	26	17	21	22	13	16	21	
	[94 $\pm$ 2]		[12 $\pm$ 4]				[27 $\pm$ 2]		[20 $\pm$ 3]		[17 $\pm$ 4]					
1250	110 *	98 *	102 *	12 *	9 *	9 *	22	27	23	14 *	14 *	14 *	19 *	16 *	17 *	
	[103 $\pm$ 6]		[10 $\pm$ 2]				[24 $\pm$ 3]		[14 $\pm$ 0]		[17 $\pm$ 2]					
2500							21 *	21 *	20 *							
							[21 $\pm$ 1]									
5000							0 *	0 *	0 *							
							[0 $\pm$ 0]									
Positive control		831	828	869 <sup>a)</sup>	383	318	386 <sup>b)</sup>	690	732	733 <sup>c)</sup>	367	362	377 <sup>d)</sup>	141	154	154 <sup>b)</sup>
		[843 $\pm$ 23]		[362 $\pm$ 38]		[718 $\pm$ 25]		[369 $\pm$ 8]		[150 $\pm$ 8]						

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

\* : Growth inhibition was observed

Table 3. Results of the bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide (2nd trial)  
[direct method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu$ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	118	118	108	11	11	15	31	29	30	24	21	24	8	7	7
		[115 $\pm$		6]	[ 12 $\pm$		2]	[ 30 $\pm$		1]	[ 23 $\pm$		2]	[ 7 $\pm$		1]
	39.1	106	108	102	13	17	14	27	26	26	21	21	27	6	8	10
		[105 $\pm$		3]	[ 15 $\pm$		2]	[ 26 $\pm$		1]	[ 23 $\pm$		3]	[ 8 $\pm$		2]
	78.1	110	110	102	9	12	14	27	24	21	21	24	22	8	9	8
		[107 $\pm$		5]	[ 12 $\pm$		3]	[ 24 $\pm$		3]	[ 22 $\pm$		2]	[ 8 $\pm$		1]
	156	115	97	110	13	11	16	30	31	29	17	16	17	8	10	7
	[107 $\pm$		9]	[ 13 $\pm$		3]	[ 30 $\pm$		1]	[ 17 $\pm$		1]	[ 8 $\pm$		2]	
313	103	104	111	14	11	13	25	26	29	18	18	17	10	12	10	
	[106 $\pm$		4]	[ 13 $\pm$		2]	[ 27 $\pm$		2]	[ 18 $\pm$		1]	[ 11 $\pm$		1]	
625	104	125	125	15	14	16	25	28	30	24	20	25	11	7	9	
	[118 $\pm$		12]	[ 15 $\pm$		1]	[ 28 $\pm$		3]	[ 23 $\pm$		3]	[ 9 $\pm$		2]	
1250	92 *	76 *	86 *	12 *	9 *	9 *	29 *	21 *	29 *	23 *	22 *	16 *	7 *	5 *	6 *	
	[ 85 $\pm$		8]	[ 10 $\pm$		2]	[ 26 $\pm$		5]	[ 20 $\pm$		4]	[ 6 $\pm$		1]	
Positive control		382	401	379 <sup>a)</sup>	337	373	394 <sup>b)</sup>	157	159	138 <sup>a)</sup>	519	554	559 <sup>c)</sup>	398	373	437 <sup>d)</sup>
		[387 $\pm$		12]	[368 $\pm$		29]	[151 $\pm$		12]	[544 $\pm$		22]	[403 $\pm$		32]

a): AF 2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu$ g/plate    b): NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5  $\mu$ g/plate

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

\* : Growth inhibition was observed

Table 4. Results of the bacterial reversion test of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide(2nd trial)  
[activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	129	112	122	15	12	13	27	25	26	33	29	26	13	11	9
		[121 $\pm$ 9]		[ 13 $\pm$ 2]		[ 26 $\pm$ 1]		[ 29 $\pm$ 4]		[ 11 $\pm$ 2]						
	39.1	111	112	119	10	13	16				26	23	27	15	13	11
		[114 $\pm$ 4]		[ 13 $\pm$ 3]							[ 25 $\pm$ 2]		[ 13 $\pm$ 2]			
	78.1	130	126	125	16	12	13				31	24	25	9	13	7
		[127 $\pm$ 3]		[ 14 $\pm$ 2]							[ 27 $\pm$ 4]		[ 10 $\pm$ 3]			
	156	131	116	124	9	13	13	25	26	32	27	28	22	12	10	13
		[124 $\pm$ 8]		[ 12 $\pm$ 2]		[ 28 $\pm$ 4]		[ 26 $\pm$ 3]		[ 12 $\pm$ 2]						
313	135	114	113	17	14	13	23	22	23	30	28	27	10	11	10	
	[121 $\pm$ 12]		[ 15 $\pm$ 2]		[ 23 $\pm$ 1]		[ 28 $\pm$ 2]		[ 10 $\pm$ 1]							
625	116	124	122	14	10	12	25	25	28	31	25	27	12	12	14	
	[121 $\pm$ 4]		[ 12 $\pm$ 2]		[ 26 $\pm$ 2]		[ 28 $\pm$ 3]		[ 13 $\pm$ 1]							
1250	100 *	97 *	106 *	10 *	10 *	11 *	24	23	25	24 *	19 *	21 *	12 *	10 *	7 *	
	[101 $\pm$ 5]		[ 10 $\pm$ 1]		[ 24 $\pm$ 1]		[ 21 $\pm$ 3]		[ 10 $\pm$ 3]							
2500							15 *	17 *	21 *							
							[ 18 $\pm$ 3]									
5000							0 *	0 *	0 *							
							[ 0 $\pm$ 0]									
Positive control		681	724	718 <sup>a)</sup>	316	359	355 <sup>b)</sup>	636	619	647 <sup>c)</sup>	391	343	341 <sup>d)</sup>	172	164	157 <sup>b)</sup>
		[708 $\pm$ 23]		[343 $\pm$ 24]		[634 $\pm$ 14]		[358 $\pm$ 28]		[164 $\pm$ 8]						

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b) : 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$     c) : 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$     d) : 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 

\* : Growth inhibition was observed