



2, 2' -アゾビス(2-メチルプロパンニトリル)  
の細菌を用いる  
復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局 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
結果および考察 .....	7
結 論 .....	8
特 記 事 項 .....	8
文 献 .....	9
Tables 1～7	

## 【要 約】

2,2'-アゾビス(2-メチルプロパンニトリル)の変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、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、S9 mix 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験、2回の本試験および再現性試験を行った。用量設定試験を 50.0~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で行ったところ、すべての検定菌において S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも抗菌性は認められなかった。したがって、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験を 313~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で用量を設定して実施した。その結果、TA1537 の S9 mix 添加試験およびその他の検定菌においては、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。TA1537 の S9 mix 無添加試験では、2回の本試験でともに変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められたが、変異コロニー数の偶発的な増加の可能性が考えられたため、2回の本試験でともに溶媒対照値の2倍以上の変異コロニー数を示した 625  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  を最高用量として、公差 100  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で5用量を設定して再現性試験を実施したが、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

TA1537 の S9 mix 無添加試験では明確な結論が得られなかったため、TA1537 および TA1537 と検出し得る変異原物質が類似している TA97 を、国立衛生試験所の能美健彦博士から分与を受けて追加試験を行った。まず、50.0~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で用量設定試験を行ったところ、いずれの検定菌においても抗菌性は認められなかったため、313~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で用量を設定して2回の本試験を行った。その結果、いずれの検定菌においても溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。これらのことから、TA1537 および TA97 の S9 mix 無添加試験においては変異原性が認められないものと考えられる。

以上の結果から、2,2'-アゾビス(2-メチルプロパンニトリル)は、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

## 【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'-アゾビス(2-メチルプロパンニトリル) 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、サルモネラ（ネズミチフス菌）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, 4)</sup>を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）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 添加試験と、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質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）および「OECD毒性試験ガイドライン：471、472」に準拠し、「化学物質GLP基準」（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）に基づいて実施した。

## 【材料および方法】

### 〔検 定 菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium* の 4 菌株は1975年10月31日に  
から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年 5 月 9 日に  
から分与  
を受けた。

ただし、TA1537 の S9 mix 無添加試験では明確な結論が得られなかったため、TA1537  
(以下 TA1537E と記載) および TA1537 と検出し得る変異原物質が類似している  
*S. typhimurium* の TA97 を、1996年 9 月 25 日に  
から分与を  
受けて追加試験を行った。

検定菌は $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存したものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異 (*rfa*) とアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ で10時間~12時間10分往復振とう培養したものを検定菌液とした。

### 〔被 験 物 質〕

2,2'-アゾビス(2-メチルプロパンニトリル) (略称: ABMPN、CAS No. 78-67-1) は、分子量 164.21 の白色結晶である。構造式等は Appendix に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99.9 wt% (不純物: 0.1% 水、メタノール) であり、

から供与された。被験物質は、使用時まで遮光して冷蔵した。

ABMPNは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: ESK4546 および DLF7632、和光純薬工業(株)) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約 3 ないし 2 で希釈し、速やかに試験に用いた。ただし、再現性試験においては、 $10.0\text{ mg/ml}$  の

調製液を等差になるように希釈を行った。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
(上野製薬(株) ロット番号 46, 純度99.9%)  
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株) ロット番号 TWR3330, 純度90%以上)  
9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co. ロット番号 96F05641 および 106F06681, 純度98%以上)  
2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株) ロット番号 DSF2950, 純度90%以上)

AF2 および 2AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 mix の組成〕

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクアガー (Difco)	0.6%	(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	D-ビチン	0.5 mM

\* : WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地 (ロット番号 : HY0302、1995年9月29日製造、HY0603、同年12月15日製造および HY2101、1997年3月7日製造) を用いた。

なお、培地 1 l あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g	水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カルシウム	10 g	バクアガー (Difco)**	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g		

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 ml を流して固めてある。

\*\* : HY2101 では、大洋寒天 (清水食品) を使用。

3) S9 mix (1 ml中下記の成分を含む)

S9***	0.1 ml	NADH	4 $\mu$ mol
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol	NADPH	4 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ 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-333、1995年9月8日製造、RAA-338、同年12月15日製造およびRAA-359、1997年2月21日製造)を用いた。PB および BF の投与量は1日目 PB 30 mg/kg、2日目 PB 60 mg/kg、3日目 PB 60mg/kgおよび BF 80 mg/kg、4日目 PB 60mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したもので、ラットの解剖およびS9 の調製は5日目であった。

[試験方法]

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合し、37°Cで20分間往復振とう培養したのち、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、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各Table 中に示した。なお、溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。培養は37°Cで48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜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、溶媒および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験および再現性試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。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、結果の再現性の確認を行った。また、TA1537 の S9 mix 無添加試験については、変異コロニー数増加の再現性と用量依存性を確認するために、再現性試験を行った。更に、追加試験として、TA1537E と TA97 の S9 mix 無添加試験について、1回の用量設定試験と2回の本試験を実施した。

〔判定基準〕

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変異コロニー数の平均値が、溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する（陽性）と判定することとした。ただし、2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が10以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。



## 【結果および考察】

### 〔用量設定試験〕

A BMPNについて 50.0~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で公比を約3として、試験を実施した (Table 1)。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とした。

### 〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験とともに、313~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で公比を2として2回の本試験を実施した (Table 2、3)。その結果、TA1537 の S9 mix 添加試験と、その他の検定菌においては、2回の本試験とも溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、TA1537 の S9 mix 無添加試験においては、本試験 I の 625  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  と本試験 II の 313、625、1250 および 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数を示したが、溶媒対照値はいずれも10以下であり、用量依存性も認められなかった。

### 〔再現性試験〕

TA1537 の S9 mix 無添加試験においては、2回の本試験とともに 625  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上となったが、それらの溶媒対照値はいずれも10以下と低く、2回の本試験で認められた変異コロニー数は、いずれも1995年10月から1996年2月の溶媒対照値の蓄積データの範囲内 (サンプル数: 77、平均値 $\pm$ 3 標準偏差: 11 $\pm$ 15) であり、用量依存性も認められなかったことから、変異コロニー数が偶発的に溶媒対照値の2倍を超えた可能性が考えられた。そこで、625  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  を最高用量として、公差 100  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で5用量を設定して、再現性試験を実施した (Table 4)。その結果、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められず、用量依存性もみられなかった。

#### 〔追加試験〕

TA1537 の S9 mix 無添加試験については、明確な結論が得られなかったため、TA1537E および TA97 を用いて、S9 mix 無添加の条件で追加試験を行った。まず、50.0～5000  $\mu\text{g}$ /プレート の範囲で公比を約 3 として、用量設定試験を実施した結果、いずれの検定菌においても抗菌性は認められなかった (Table 5)。この結果に基づいて、313～5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で公比を 2 として 2 回の本試験を実施した (Table 6、7)。その結果、いずれの検定菌においても溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。再現性試験と追加試験の結果から、当該被験物質は S9 mix 無添加の条件で、TA1537 および TA97 に対して変異原性を示さないものと考えられる。

ABMPN について実施したすべての試験において、陽性対照群ではいずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照群とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験系の有効性が確認された。

#### 【結 論】

以上の結果に基づき、2,2'-アゾビス(2-メチルプロパンニトリル) 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。

#### 【特 記 事 項】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態、および試験計画書からの逸脱はなかった。ただし、TA1537 の S9 mix 無添加試験においては、本試験の結果に再現性試験および追加試験の結果を併せて総合的に判定した。

【文 献】

- 1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: in "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D.M., Ames, B.N.: *Mutat. Res.* 113: 173-215 (1983)
- 3) Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360
- 4) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984) pp.161-187

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ /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			
S9mix (-)	0	165	130	140	6	24	20	28	27	14	26	35	28	9	8	8	
		( 145 $\pm$ 18.0 )			( 17 $\pm$ 9.5 )			( 23 $\pm$ 7.8 )			( 30 $\pm$ 4.7 )			( 8 $\pm$ 0.6 )			
	50.0	127			15			17			20			19			
	150	135			13			14			32			18			
	500	154			8			18			22			14			
	1500 c	127			10			15			20			18			
	5000 c	140			13			10			21			6			
S9mix (+)	0	175	132	131	8	12	13	32	19	29	32	20	28	14	18	10	
		( 146 $\pm$ 25.1 )			( 11 $\pm$ 2.6 )			( 27 $\pm$ 6.8 )			( 27 $\pm$ 6.1 )			( 14 $\pm$ 4.0 )			
	50.0	165			9			20			38			6			
	150	146			16			23			31			7			
	500 c	128			9			22			21			13			
	1500 c	126			8			21			26			10			
	5000 c	155			12			18			22			10			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	832	827	800	264	234	231	672	603	604	316	305	287	312	324	334	
		( 820 $\pm$ 17.2 )			( 243 $\pm$ 18.2 )			( 626 $\pm$ 39.6 )			( 303 $\pm$ 14.6 )			( 323 $\pm$ 11.0 )			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 99.9 wt% and 0.1% water and methanol were contained as impurities.

Table 2. Results of reverse mutation test ( I ) of 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	134	126	134	8	8	11	21	30	16	26	17	31	11	5	8	
		( 131 ± 4.6 )			( 9 ± 1.7 )			( 22 ± 7.1 )			( 25 ± 7.1 )			( 8 ± 3.0 )			
	313	130	125	94	14	5	12	19	14	23	21	30	27	12	10	11	
		( 116 ± 19.5 )			( 10 ± 4.7 )			( 19 ± 4.5 )			( 26 ± 4.6 )			( 11 ± 1.0 )			
	625	113	135	127	8	10	13	17	22	19	25	28	23	20	16	17	
		( 125 ± 11.1 )			( 10 ± 2.5 )			( 19 ± 2.5 )			( 25 ± 2.5 )			( 18 ± 2.1 )			
	1250	128	141	102	9	11	13	23	23	18	23	35	26	19	15	9	
		( 124 ± 19.9 )			( 11 ± 2.0 )			( 21 ± 2.9 )			( 28 ± 6.2 )			( 14 ± 5.0 )			
2500 c	108	122	152	10	12	14	13	12	18	12	31	30	13	13	7		
	( 127 ± 22.5 )			( 12 ± 2.0 )			( 14 ± 3.2 )			( 24 ± 10.7 )			( 11 ± 3.5 )				
5000 c	116	105	115	11	11	14	12	22	11	28	23	27	22	12	10		
	( 112 ± 6.1 )			( 12 ± 1.7 )			( 15 ± 6.1 )			( 26 ± 2.6 )			( 15 ± 6.4 )				
S9mix (+)	0	135	117	120	7	9	11	37	24	17	31	37	29	20	16	16	
		( 124 ± 9.6 )			( 9 ± 2.0 )			( 26 ± 10.1 )			( 32 ± 4.2 )			( 17 ± 2.3 )			
	313	144	160	125	6	10	14	21	21	20	24	37	24	19	15	16	
		( 143 ± 17.5 )			( 10 ± 4.0 )			( 21 ± 0.6 )			( 28 ± 7.5 )			( 17 ± 2.1 )			
	625	131	120	142	9	12	15	33	21	28	28	26	24	18	14	12	
		( 131 ± 11.0 )			( 12 ± 3.0 )			( 27 ± 6.0 )			( 26 ± 2.0 )			( 15 ± 3.1 )			
	1250 c	136	134	143	15	15	10	20	22	25	29	34	37	12	15	15	
		( 138 ± 4.7 )			( 13 ± 2.9 )			( 22 ± 2.5 )			( 33 ± 4.0 )			( 14 ± 1.7 )			
2500 c	107	138	161	9	9	10	28	35	29	26	26	33	11	14	18		
	( 135 ± 27.1 )			( 9 ± 0.6 )			( 31 ± 3.8 )			( 28 ± 4.0 )			( 14 ± 3.5 )				
5000 c	141	112	110	7	11	9	29	27	20	24	31	28	13	9	12		
	( 121 ± 17.3 )			( 9 ± 2.0 )			( 25 ± 4.7 )			( 28 ± 3.5 )			( 11 ± 2.1 )				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	648	616	550	382	328	300	270	237	270	775	763	696	368	455	369	
		( 605 ± 50.0 )			( 337 ± 41.7 )			( 259 ± 19.1 )			( 745 ± 42.6 )			( 397 ± 49.9 )			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	313	467	416	233	256	232	393	421	453	447	333	323	307	314	309	
		( 399 ± 78.4 )			( 240 ± 13.6 )			( 422 ± 30.0 )			( 368 ± 68.9 )			( 310 ± 3.6 )			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 99.9 wt% and 0.1% water and methanol were contained as impurities.

Table 3. Results of reverse mutation test ( II ) of 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ /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							
S9mix (-)	0	111	91	119	9	11	6	22	23	21	29	18	20	6	5	5	( 107 $\pm$ 14.4 )	( 9 $\pm$ 2.5 )	( 22 $\pm$ 1.0 )	( 22 $\pm$ 5.9 )	( 5 $\pm$ 0.6 )
	313	110	112	121	13	8	8	30	25	31	26	14	15	14	15	21	( 114 $\pm$ 5.9 )	( 10 $\pm$ 2.9 )	( 29 $\pm$ 3.2 )	( 18 $\pm$ 6.7 )	( 17 $\pm$ 3.8 )
	625	105	122	130	15	21	14	29	27	25	15	37	20	13	16	20	( 119 $\pm$ 12.8 )	( 17 $\pm$ 3.8 )	( 27 $\pm$ 2.0 )	( 24 $\pm$ 11.5 )	( 16 $\pm$ 3.5 )
	1250	115	106	122	14	8	17	20	25	15	29	28	23	13	20	7	( 114 $\pm$ 8.0 )	( 13 $\pm$ 4.6 )	( 20 $\pm$ 5.0 )	( 27 $\pm$ 3.2 )	( 13 $\pm$ 6.5 )
	2500 c	125	108	121	13	12	14	17	16	13	23	19	18	11	9	8	( 118 $\pm$ 8.9 )	( 13 $\pm$ 1.0 )	( 15 $\pm$ 2.1 )	( 20 $\pm$ 2.6 )	( 9 $\pm$ 1.5 )
	5000 c	113	93	130	13	18	6	19	27	19	15	21	18	10	9	17	( 112 $\pm$ 18.5 )	( 12 $\pm$ 6.0 )	( 22 $\pm$ 4.6 )	( 18 $\pm$ 3.0 )	( 12 $\pm$ 4.4 )
S9mix (+)	0	94	118	113	18	8	18	37	40	24	27	31	31	19	16	10	( 108 $\pm$ 12.7 )	( 15 $\pm$ 5.8 )	( 34 $\pm$ 8.5 )	( 30 $\pm$ 2.3 )	( 15 $\pm$ 4.6 )
	313	117	106	113	13	17	11	31	30	28	21	30	32	18	14	18	( 112 $\pm$ 5.6 )	( 14 $\pm$ 3.1 )	( 30 $\pm$ 1.5 )	( 28 $\pm$ 5.9 )	( 17 $\pm$ 2.3 )
	625	138	110	99	14	14	15	27	25	25	24	37	29	18	22	12	( 116 $\pm$ 20.1 )	( 14 $\pm$ 0.6 )	( 26 $\pm$ 1.2 )	( 30 $\pm$ 6.6 )	( 17 $\pm$ 5.0 )
	1250 c	128	119	116	12	9	13	24	20	29	21	31	28	12	13	17	( 121 $\pm$ 6.2 )	( 11 $\pm$ 2.1 )	( 24 $\pm$ 4.5 )	( 27 $\pm$ 5.1 )	( 14 $\pm$ 2.6 )
	2500 c	129	114	126	9	10	9	24	25	30	29	23	19	17	16	8	( 123 $\pm$ 7.9 )	( 9 $\pm$ 0.6 )	( 26 $\pm$ 3.2 )	( 24 $\pm$ 5.0 )	( 14 $\pm$ 4.9 )
	5000 c	130	112	127	11	8	7	18	20	18	22	21	31	7	9	9	( 123 $\pm$ 9.6 )	( 9 $\pm$ 2.1 )	( 19 $\pm$ 1.2 )	( 25 $\pm$ 5.5 )	( 8 $\pm$ 1.2 )
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2			10			0.5			2							
	Number of colonies / plate	848	756	734	375	376	378	235	253	233	708	694	663	1002	1120	887	( 779 $\pm$ 60.5 )	( 376 $\pm$ 1.5 )	( 240 $\pm$ 11.0 )	( 688 $\pm$ 23.0 )	( 1003 $\pm$ 116.5 )
		912	959	942	289	281	310	521	748	741	354	335	352	453	468	388	( 938 $\pm$ 23.8 )	( 293 $\pm$ 15.0 )	( 670 $\pm$ 129.1 )	( 347 $\pm$ 10.4 )	( 436 $\pm$ 42.5 )

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 99.9 wt% and 0.1% water and methanol were contained as impurities.



Table 5. Results of preliminary cytotoxicity test in additional reverse mutation test of 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)								
					Frameshift type					
					TA1537E		TA97			
S9mix (-)	0				14	6	13	148	150	128
					( 11 ± 4.4 )		( 142 ± 12.2 )			
	50.0				2		166			
	150				6		174			
	500				9		136			
	1500 c				9		130			
	5000 c				13		123			
Positive control S9 mix (-)	Chemical				9AA		9AA			
	Dose (µg /plate)				80		80			
	Number of colonies / plate				852	925	1269	2325	2261	2400
					( 1015 ± 222.7 )		( 2329 ± 69.6 )			

9AA: 9-Aminoacridine, c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.  
 TA1537E: TA1537 strain obtained from Dr. T. Nohmi of National Institute of Health Sciences.  
 Purity was 99.9 wt% and 0.1% water and methanol were contained as impurities.





Table 7. Results of additional reverse mutation test ( II ) of 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)									
					Frameshift type						
					TA1537E			TA97			
S9mix (-)	0				21	10	16	130	125	150	
					(	16 ±	5.5)	(	135 ±	13.2)	
	313				12	12	8	130	135	137	
					(	11 ±	2.3)	(	134 ±	3.6)	
	625				9	7	6	146	129	115	
					(	7 ±	1.5)	(	130 ±	15.5)	
	1250				7	12	11	134	141	133	
				(	10 ±	2.6)	(	136 ±	4.4)		
2500 c				18	14	13	124	159	140		
				(	15 ±	2.6)	(	141 ±	17.5)		
5000 c				13	19	13	152	138	131		
				(	15 ±	3.5)	(	140 ±	10.7)		
Positive control	Chemical				9AA			9AA			
	Dose (µg /plate)				80			80			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate				514	542	594	1536	1282	1501	
					(	550 ±	40.6)	(	1440 ±	137.7)	

9AA: 9-Aminoacridine                      c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.  
 TA1537E: TA1537 strain obtained from Dr. T. Nohmi of National Institute of Health Sciences.  
 Purity was 99.9 wt% and 0.1% water and methanol were contained as impurities.