

# 最 終 報 告 書

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : 6250 ( 115－158 )

平成 15 年 12 月 26 日

試験委託者  
厚生労働省 医薬局

財団法人  
食品農薬製品安全性評価センター

## 目次

|               |    |
|---------------|----|
| 1. 要約         | 6  |
| 13. 被験物質      | 10 |
| 14. 試験材料および方法 | 12 |
| 15. 試験結果      | 20 |
| 16. 考察および結論   | 22 |
| 17. 参考文献      | 23 |

|          |                                                                                                  |         |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Figures  |                                                                                                  | F-01~11 |
| Figure 1 | Dose-finding study with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA100           | F-01    |
| Figure 2 | Dose-finding study with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA1535          | F-02    |
| Figure 3 | Dose-finding study with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain WP2 <i>uvrA</i> | F-03    |
| Figure 4 | Dose-finding study with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA98            | F-04    |
| Figure 5 | Dose-finding study with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA1537          | F-05    |

|           |                                                                                                                             |       |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Figure 6  | Bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide<br>in strain TA100                              | F-06  |
| Figure 7  | Bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide<br>in strain TA1535                             | F-07  |
| Figure 8  | Bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide<br>in strain WP2 <i>uvrA</i>                    | F-08  |
| Figure 9  | Bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide<br>in strain TA98                               | F-09  |
| Figure 10 | Bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide<br>in strain TA1537                             | F-10  |
| Figure 11 | Confirmative examination of Benzensulfonic acid,<br>4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA1537                              | F-11  |
| Tables    |                                                                                                                             | T-1~5 |
| Table 1   | Summary data of dose-finding study with Benzensulfonic acid,<br>4,4'-oxybis-, dihydrazide [non-activation method : -S9]     | T-1   |
| Table 2   | Summary data of dose-finding study with Benzensulfonic acid,<br>4,4'-oxybis-, dihydrazide [activation method : +S9]         | T-2   |
| Table 3   | Results of the bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid,<br>4,4'-oxybis-, dihydrazide [non-activation method : -S9] | T-3   |
| Table 4   | Results of the bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid,<br>4,4'-oxybis-, dihydrazide [activation method : +S9]     | T-4   |
| Table 5   | Results of the confirmative examination of Benzensulfonic acid,<br>4,4'-oxybis-, dihydrazide [non-activation method : -S9]  | T-5   |

## 1. 要約

本試験条件下において, Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide には遺伝子突然変異を誘起する作用があるものと判断した.

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide 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, Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide 処理では TA100, TA1535 および WP2 *uvrA* で代謝活性化系非存在下ならびに代謝活性化系存在下いずれにおいても用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加が認められた. TA1537 株 (-S9 処理) では, 復帰突然変異試験において 5000 µg / プレートでのみ復帰突然変異コロニーの増加がみられ陽性判定基準の 2 倍を僅かに超えたことから確認試験を実施した. 確認試験においては復帰突然変異コロニー数の明確な増加傾向は観察されず, 再現性も認められないことから陰性反応と判断した.

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.

13. 被験物質

13.1. 被験物質名

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide

13.2. ロット番号

13.3. 純度／含量

99.3 wt%

13.4. 不純物の名称および純度

4,4'-オキシビス (ベンゼンスルホン酸) および 4,4'-オキシビス (ベンゼン  
スルホニルクロライド) を微量に含有する.

13.5. 提供元

13.6. 保存条件

室温保存

13.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-3)

13.8. 略称

OBSH

13.9. 化学名

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide

13.10. CAS No.

80-51-3

13.11. 分子式

$C_{12}H_{14}N_4O_5S_2$

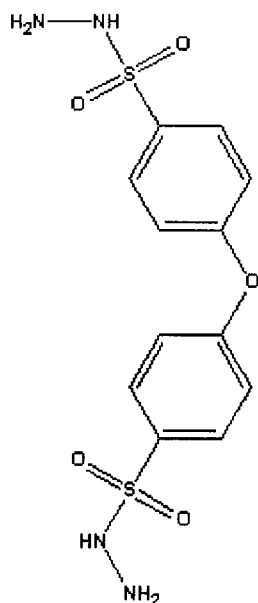
13.12. 分子量

358.40

13.13. 物質の状態

白色微粉末

13.14. 化学構造



13.15. 融点

161.5°C (社内法による)

13.16. 安定性

常温では安定であるが、炎・火花・高温体と接触した場合、分解を起こして燃焼する (分解温度, 164°C).

13.17. 溶解性

水 : 0.02 g/100 g, DMSO : 易溶, 7%塩酸 : 22.0 g/100 g, アセトン : 反応する.

13.18. 取り扱い上の注意

酸化性物質や強酸との混合により、分解を起こして火災を発生する可能性がある。火気との接触は厳禁である。

衣服、履物、手袋等に付着した異物の混入を避けるため、清潔な服装で取り扱う。

13.19. 残余被験物質の処理

被験物質の一部 (1 g) を保存した後、残りは被験物質提供元へ返却した。

## 14. 試験材料および方法

### 14.1. 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。

|         |                 |                     |
|---------|-----------------|---------------------|
| ネズミチフス菌 | TA100           | (ヒスチジン要求性の塩基対置換型)   |
| 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) |
| ネズミチフス菌 | TA1535          | (ヒスチジン要求性の塩基対置換型)   |
| 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) |
| 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13年10月2～5日(TA100 および TA98)、平成13年10月19～22日(TA1535 および WP2 *uvrA*) および平成14年5月23～27日(TA1537)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. K26414578 013【TA1537以外】, Lot No. K26414578 032【TA1537】)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℃)した。

### 14.2. 培地の調製

#### 14.2.1. 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14年5月16日製造, Lot No. ANI300ER)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 (BA-30A : 伊那食品工業株式会社 ; Lot No. 20108) | 15   | g  |
| 精製水                                      | 1000 | mL |

#### 14.2.2. 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. 0340002) 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-ビオチン (関東化学株式会社 ; Lot No. 301C2275) 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. 008D2026) 水溶液を同じく 1 容量加えた.

#### 14.3. 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  $\mu$ 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   | 3.81                       | 3.47   | 3.85            | 2.84 | 1.56   |
| 復帰突然変異試験 | 3.35                       | 3.57   | 4.43            | 2.87 | 1.53   |
| 確認試験     | -                          | -      | -               | -    | 1.12   |

#### 14.4. 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-457）を試験に使用した。

##### 14.4.1. 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-457                                                                        |
| 製造年月日          | 平成 14 年 1 月 18 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             | 207～243 g                                                                      |
| 臓器             | 肝臓                                                                             |
| 誘導物質           | Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)                                   |
| 投与量および<br>投与回数 | PB : 30 mg/kg 1 回 (1 日目),<br>60 mg/kg 3 回 (2～4 日目)<br>BF : 80 mg/kg 1 回 (3 日目) |
| 投与方法           | 腹腔内投与                                                                          |
| 蛋白含量           | 27.32 mg/mL                                                                    |

##### 14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を次に示した。

|                    |          |
|--------------------|----------|
| 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 |

#### 14.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に易溶であることから、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 032) 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。

#### 14.6. 対照群

##### 14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒で試験した。

##### 14.6.2. 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 032) 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<sub>3</sub> アジ化ナトリウム  
(和光純薬工業株式会社 ; 純度 99.9% ; Lot No. KSE1776)

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》

|                  |      |         |                        |
|------------------|------|---------|------------------------|
| AF-2             | 0.01 | μg/プレート | (ネズミチフス菌：TA100)        |
| AF-2             | 0.1  | 〃       | (ネズミチフス菌：TA98)         |
| NaN <sub>3</sub> | 0.5  | 〃       | (ネズミチフス菌：TA1535)       |
| 9-AA             | 80   | 〃       | (ネズミチフス菌：TA1537)       |
| AF-2             | 0.01 | 〃       | (大腸菌：WP2 <i>uvrA</i> ) |

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

|      |     |         |                        |
|------|-----|---------|------------------------|
| 2-AA | 1   | μg/プレート | (ネズミチフス菌：TA100)        |
| 2-AA | 0.5 | 〃       | (ネズミチフス菌：TA98)         |
| 2-AA | 2   | 〃       | (ネズミチフス菌：TA1535)       |
| 2-AA | 2   | 〃       | (ネズミチフス菌：TA1537)       |
| 2-AA | 10  | 〃       | (大腸菌：WP2 <i>uvrA</i> ) |

なお、これらの試験用量は旧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。

#### 14.6.3. 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°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。

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide 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。

#### 14.7. 用量設定試験（予備試験）

##### 14.7.1. 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。

14.7.2. 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。

14.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

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  $\mu$ L、代謝活性化系存在下 (+S9 mix) 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、ウォーターバスシェーカー (MM-10 および 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 (120 回/分; 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 (SSV-R11DA : 株式会社池田理化) を用いて 37°C の条件で 48 時間各プレートを培養した。

14.7.4. 析出等の観察

各処理法において処理開始およびコロニー数計測時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.7.5. 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。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。

14.8. 復帰突然変異試験

14.8.1. 試験用量

用量設定試験の結果、TA100, TA1535 および WP2 *uvrA* では陽性反応が認められた。これらの菌株では正確な用量反応曲線が求められるような用量を、残りの菌株では生育阻害作用が認められなかったことから 5000  $\mu$ g / プレート最高用量とし、それぞれ 5~6 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 mix》

| 菌株              | 試験用量 (μg/プレート) |      |      |      |      |      |
|-----------------|----------------|------|------|------|------|------|
| TA100           | 4.88           | 9.77 | 19.5 | 39.1 | 78.1 | 156  |
| TA1535          | 2.44           | 4.88 | 9.77 | 19.5 | 39.1 | 78.1 |
| WP2 <i>uvrA</i> | 39.1           | 78.1 | 156  | 313  | 625  | 1250 |
| TA98            | 313            | 625  | 1250 | 2500 | 5000 |      |
| TA1537          | 313            | 625  | 1250 | 2500 | 5000 |      |

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

| 菌株              | 試験用量 (μg/プレート) |      |      |      |      |      |
|-----------------|----------------|------|------|------|------|------|
| TA100           | 4.88           | 9.77 | 19.5 | 39.1 | 78.1 | 156  |
| TA1535          | 0.610          | 1.22 | 2.44 | 4.88 | 9.77 | 19.5 |
| WP2 <i>uvrA</i> | 39.1           | 78.1 | 156  | 313  | 625  | 1250 |
| TA98            | 313            | 625  | 1250 | 2500 | 5000 |      |
| TA1537          | 313            | 625  | 1250 | 2500 | 5000 |      |

また、復帰突然変異試験の TA1537 (-S9 mix) において 1 用量のみ復帰突然変異コロニー数が陰性対照の 2 倍を超えていたことから以下に示す 7 用量を用いた確認試験を実施した。

| 菌株     | 試験用量 (μg/プレート) |     |     |      |      |      |      |
|--------|----------------|-----|-----|------|------|------|------|
| TA1537 | 439            | 658 | 988 | 1481 | 2222 | 3333 | 5000 |

14.8.2. 使用プレート数および識別

14.7.2.に記載の方法に準じた。

14.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

14.7.3.に記載の方法に準じた。

14.8.4. 析出等の観察

14.7.4.に記載の方法に準じた。

14.8.5. コロニー数計測

14.7.5.に記載の方法に準じた。

#### 14.9. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した。なお、陽性と判定した場合には、変異原性の強さの相対的比較値である比活性を下式で求めた。コロニー数の平均値は四捨五入する以前の値を用いた。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

$$\frac{(\text{当該濃度での平均コロニー数}) - (\text{陰性対照での平均コロニー数})}{\text{当該濃度値 (mg)}}$$

## 15. 試験結果

### 15.1. 用量設定試験

#### 15.1.1. 試験結果

結果を Figure 1～5 および Table 1, 2 に示した.

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide 処理の場合, 代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) ならびに代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の TA100, TA1535 および WP2 *uvrA* で用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められた. また, -S9 処理, +S9 処理とも試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった.

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.

#### 15.1.2. 被験物質の析出等

被験物質処理時, -S9 処理, +S9 処理とも 1667  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状あるいは白色繊維状の析出物が認められた. コロニー計数時, 両試験法の 1667  $\mu\text{g}$ /プレート以上で白色粉末状の析出物が観察された.

### 15.2. 復帰突然変異試験

#### 15.2.1. 試験結果

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, -S9 処理ならびに+S9 処理の TA100, TA1535 および WP2 *uvrA* で用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められた. さらに-S9 処理の TA1537 において 5000  $\mu\text{g}$ /プレートで復帰突然変異コロニー数が僅かに増加しており, 陰性対照の 2 倍を超えていた. また, -S9 処理, +S9 処理とも試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった.

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.

#### 15.2.2. 被験物質の析出等

被験物質処理時, -S9 処理で 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上, +S9 処理では 1250  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状あるいは白色繊維状の析出物が認められた. コロニー計数時, 両試験法の 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上で白色粉末状

の析出物が観察された。

### 15.3. 確認試験

#### 15.3.1. 試験結果

試験結果を Figure 11 および Table 5 に示した。

被験物質処理群の場合、いずれの用量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 TA1537 に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。

#### 15.3.2. 被験物質の析出等

被験物質処理時、1481 µg/プレート以上の用量で、コロニー計数時、2222 µg/プレート以上でそれぞれ白色粉末状の析出物が観察された。

### 15.4. 比活性

前述の結果から求めた変異原性の強さに関する相対的比較値である比活性 (mg 当たり) は、以下の通りであった。

| 試験       | S9 | 菌株              | 試験用量         | 比活性   |
|----------|----|-----------------|--------------|-------|
| 用量設定試験   | -  | TA100           | 61.7 µg/プレート | 3133  |
|          | -  | TA1535          | 20.6 µg/プレート | 5178  |
|          | -  | WP2 <i>uvrA</i> | 556 µg/プレート  | 141   |
|          | +  | TA100           | 61.7 µg/プレート | 3614  |
|          | +  | TA1535          | 2.29 µg/プレート | 8734  |
|          | +  | WP2 <i>uvrA</i> | 556 µg/プレート  | 88    |
| 復帰突然変異試験 | -  | TA100           | 39.1 µg/プレート | 3333  |
|          | -  | TA1535          | 4.88 µg/プレート | 4235  |
|          | -  | WP2 <i>uvrA</i> | 313 µg/プレート  | 149   |
|          | +  | TA100           | 39.1 µg/プレート | 4365  |
|          | +  | TA1535          | 4.88 µg/プレート | 11475 |
|          | +  | WP2 <i>uvrA</i> | 1250 µg/プレート | 70    |



## 16. 考察および結論

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide 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  $\mu\text{g}$ /プレートあるいは正確な用量反応曲線が求められるような用量範囲を検討した. その結果, Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide 処理群では代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) および代謝活性化系存在下 (+S9 処理) のいずれにおいても, 塩基対置換型の菌株すなわち TA100, TA1535 および WP2 *uvrA* で試験用量に依存した復帰突然変異コロニー数の明確な増加が認められた. 本結果から変異原性の強さに関する相対的比較値である比活性の最高値は 11475 (+S9 処理, TA1535, 4.88  $\mu\text{g}$ /プレート) と算出された.

また, 本被験物質 Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide について, Ames 試験で陽性との報告<sup>1)</sup>があった. また, 類縁体である  $\beta$ -phenylethylhydrazine sulfate についても Ames 試験で陽性<sup>1)</sup>であった. さらに, 本被験物質について, ラットおよびマウスを用いた UDS 試験についても陽性結果との報告<sup>2)</sup>があった.

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 (Appendix 1) の概ね範囲内であり, 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 Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide の微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定した.

17. 参考文献

- 1) 清水英佑, 林和夫, 竹村望 : ヒドラジン化合物の突然変異誘起性に関する研究, とくに発がん性との関係について: Nippon Eiseigaku Zasshi. Japanese Journal of Hygiene.; VOL. 33: p.474-485; 1978
- 2) Genotoxicity of a Variety of Hydrazine Derivatives in the Hepatocyte Primary Culture/DNA Repair Test Using Rat and Mouse Hepatocytes. : Japanese Journal of Cancer Research : Feb.79(2),P204-211; 1988

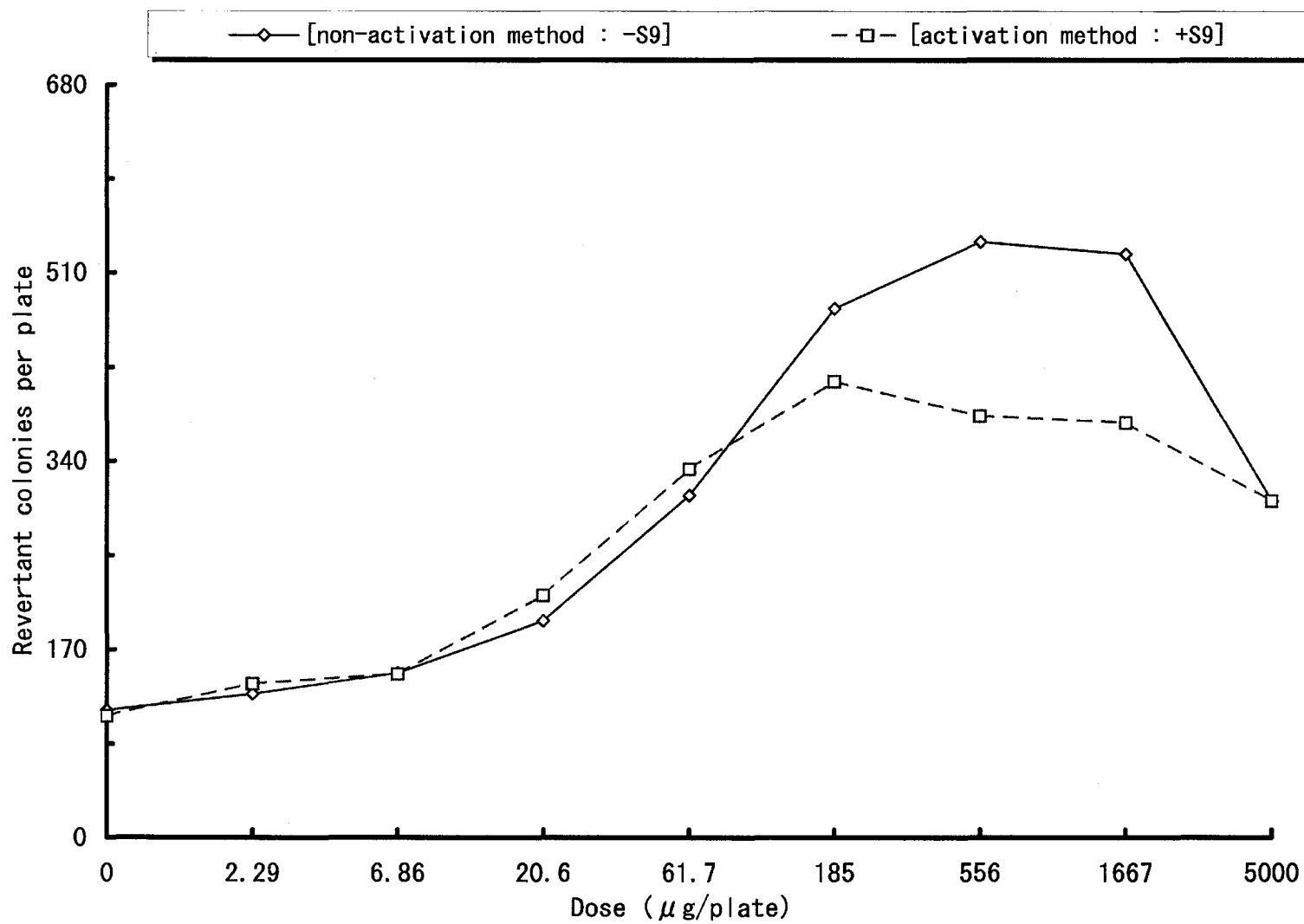


Figure 1. Dose-finding study with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA100

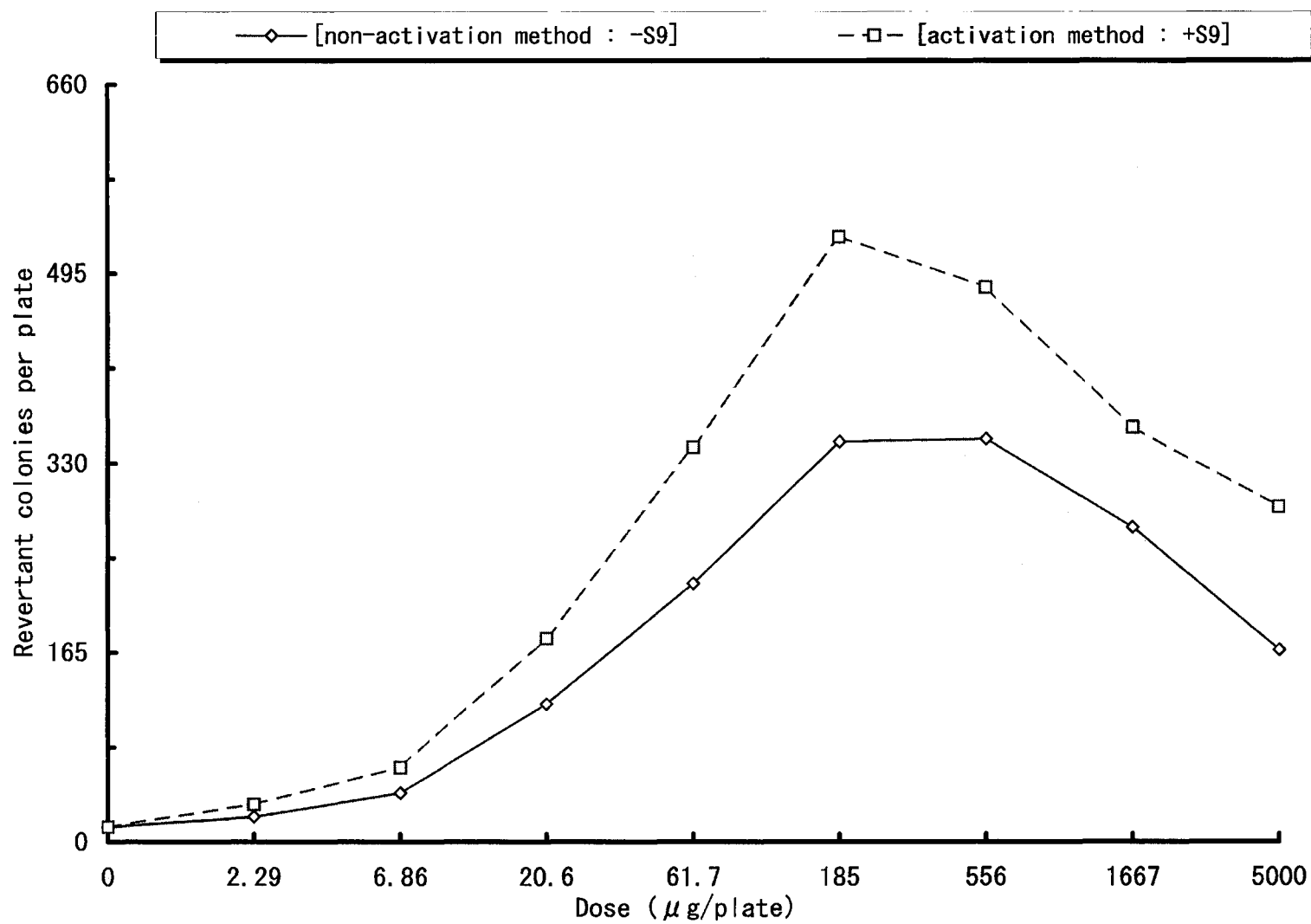


Figure 2. Dose-finding study with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA1535

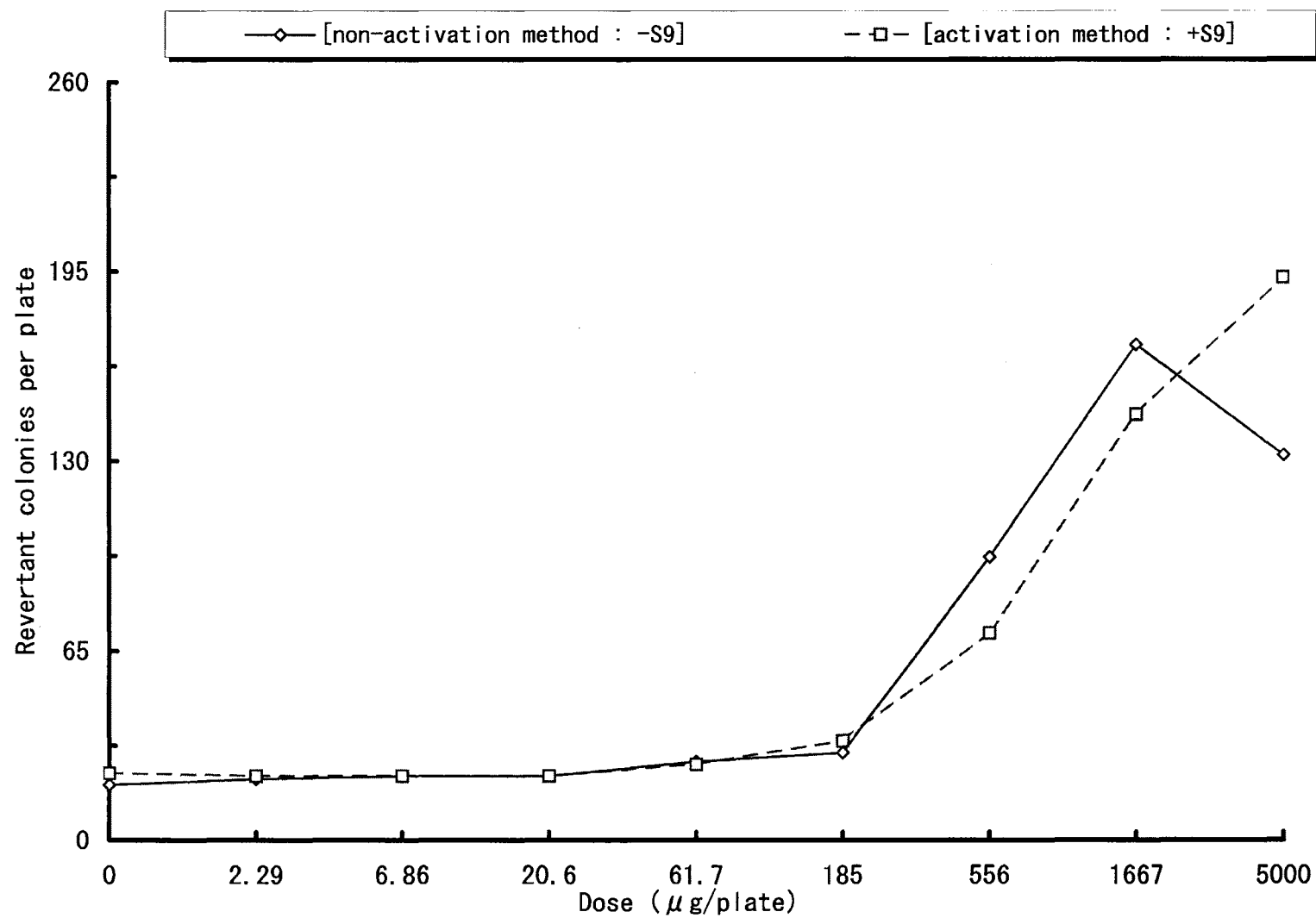


Figure 3. Dose-finding study with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain WP2uvrA

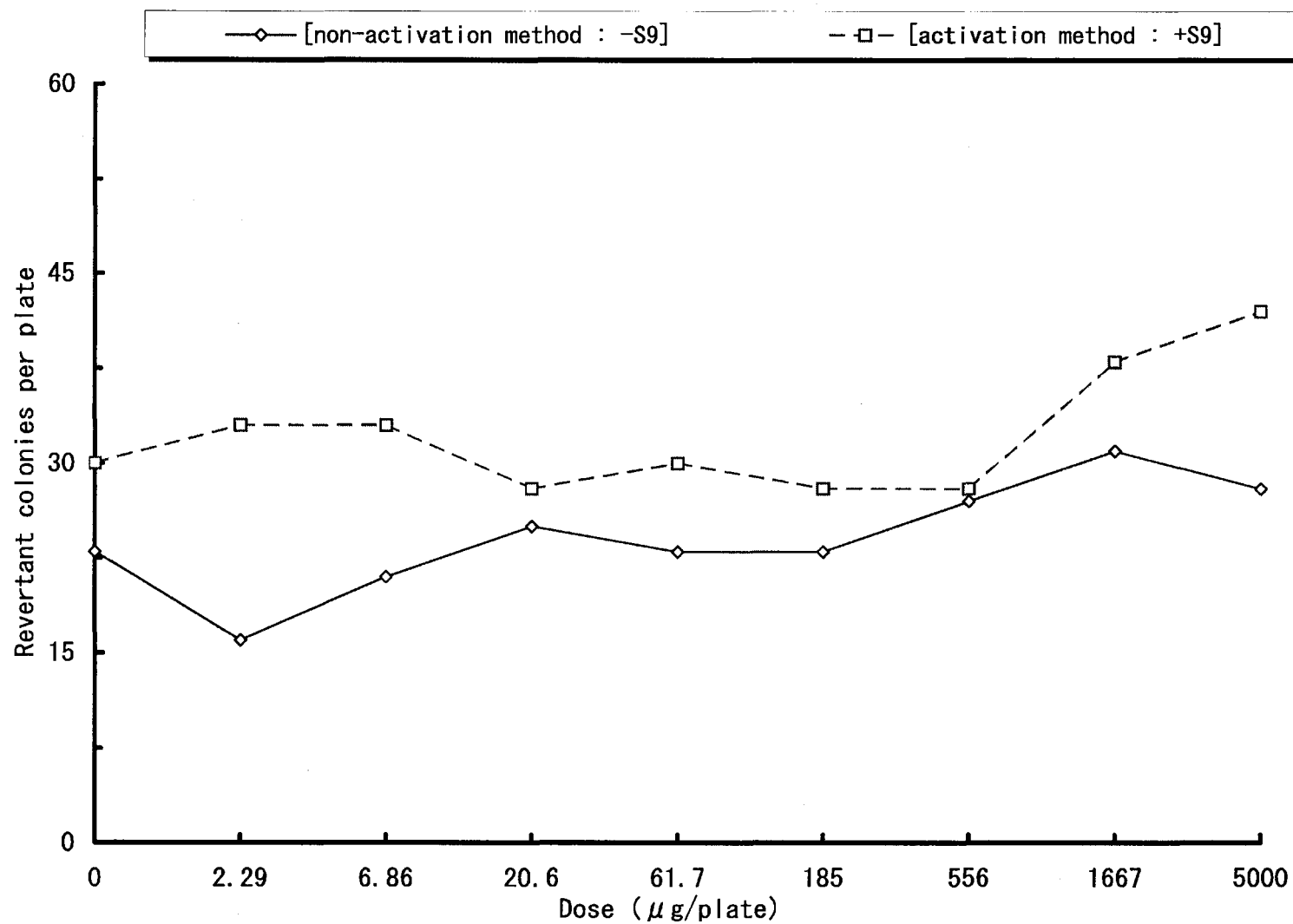


Figure 4. Dose-finding study with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA98

F-05

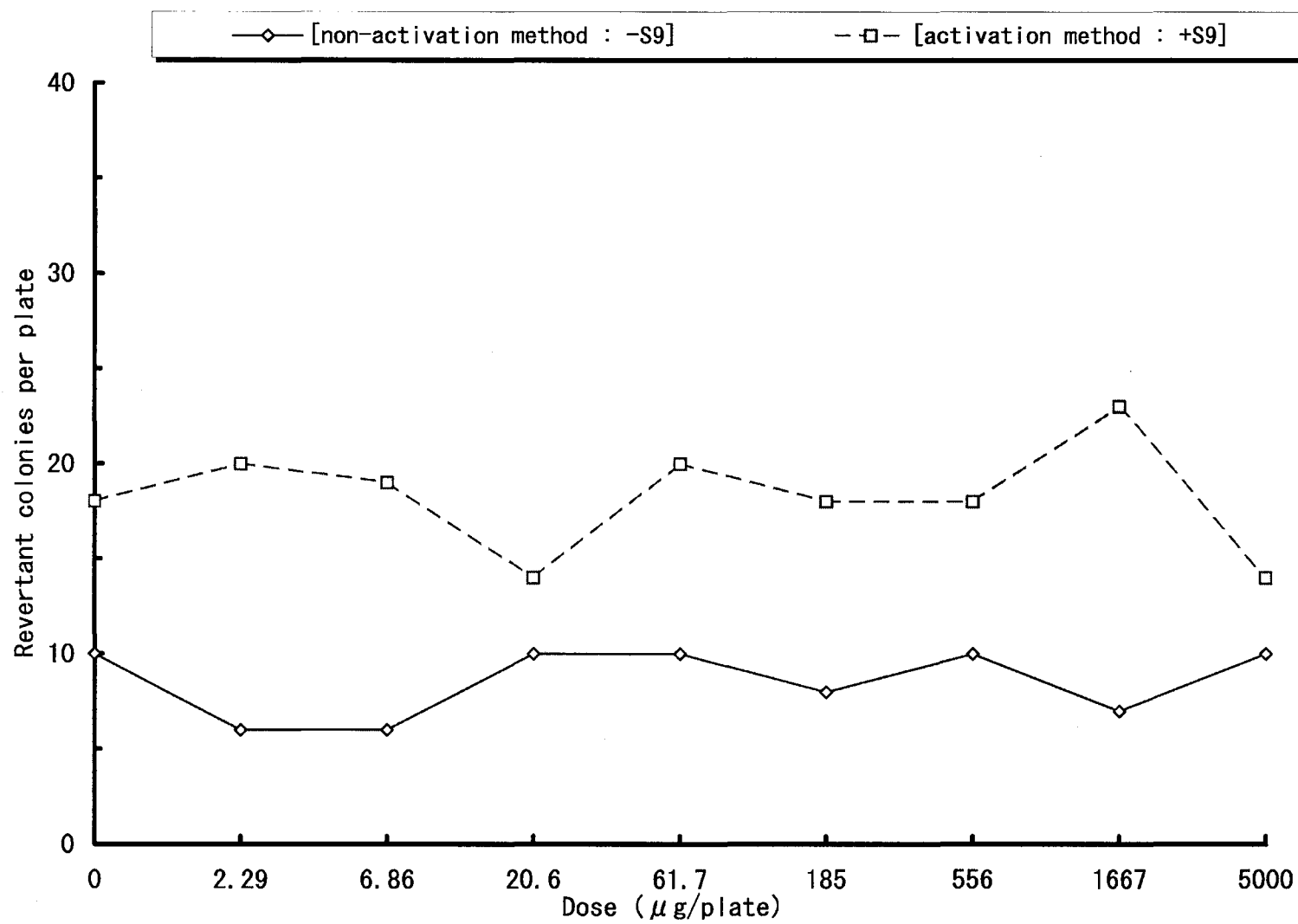


Figure 5. Dose-finding study with Benzenesulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA1537

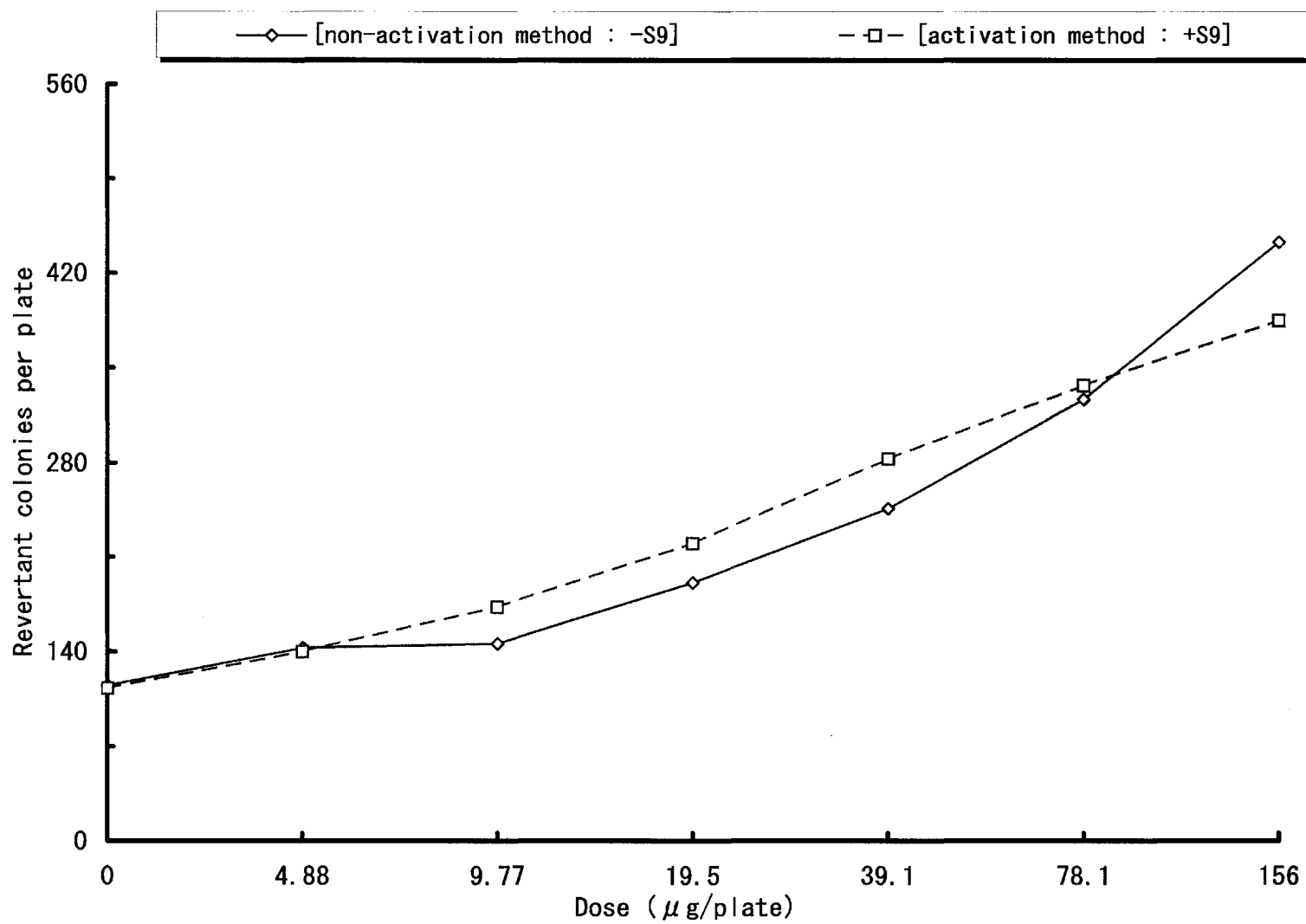


Figure 6. Bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA100



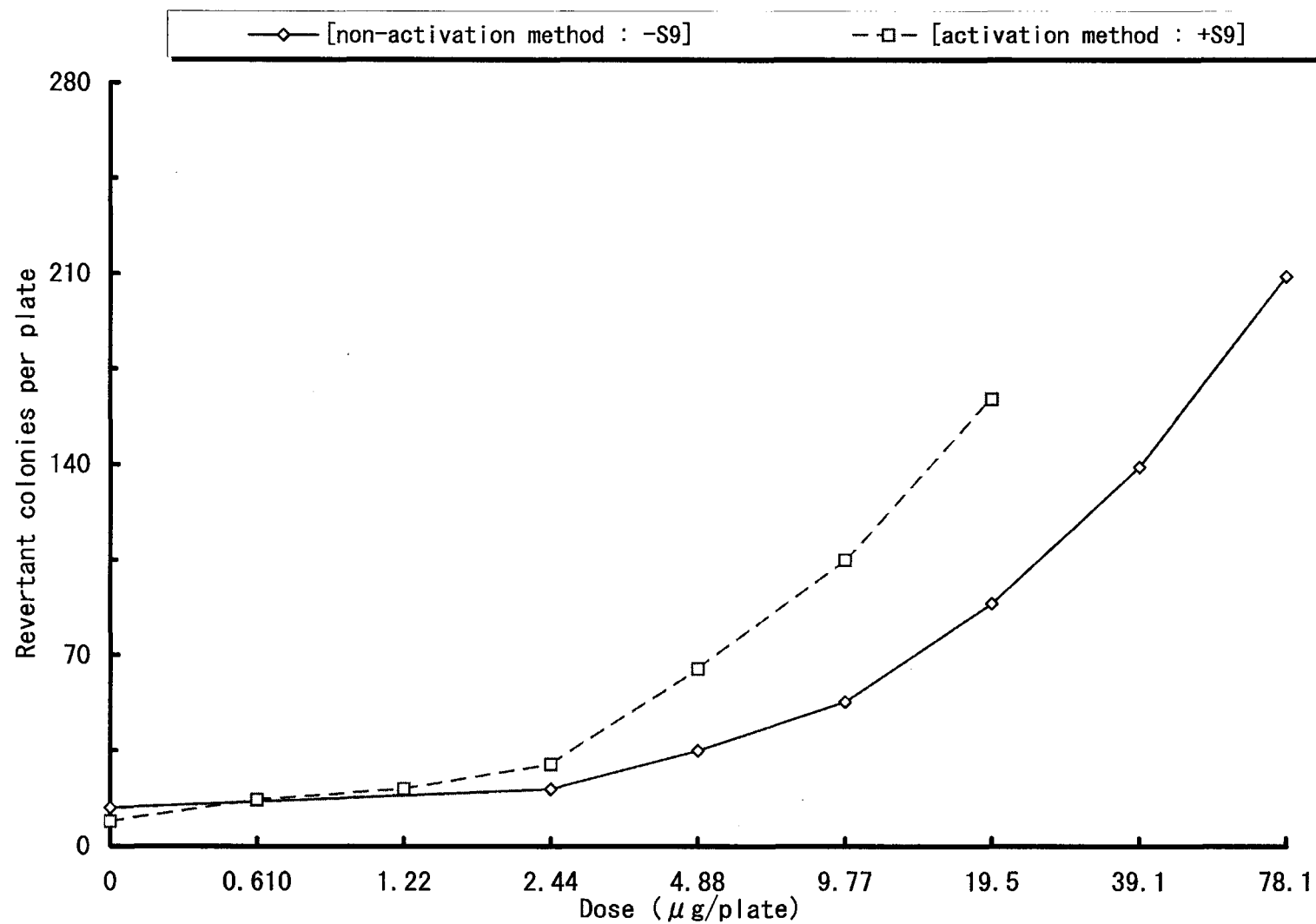


Figure 7. Bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA1535

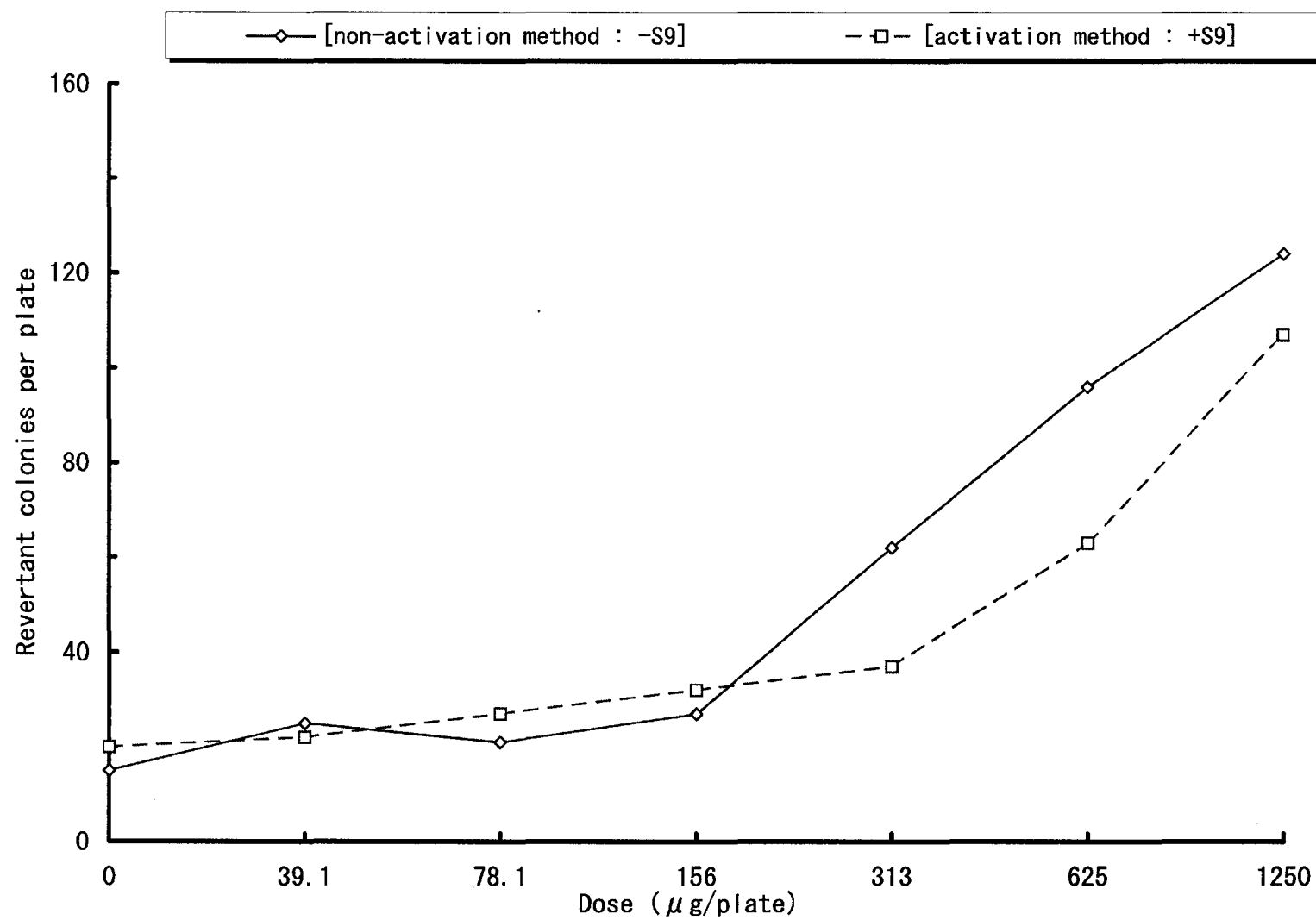


Figure 8. Bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain WP2uvrA

F-09

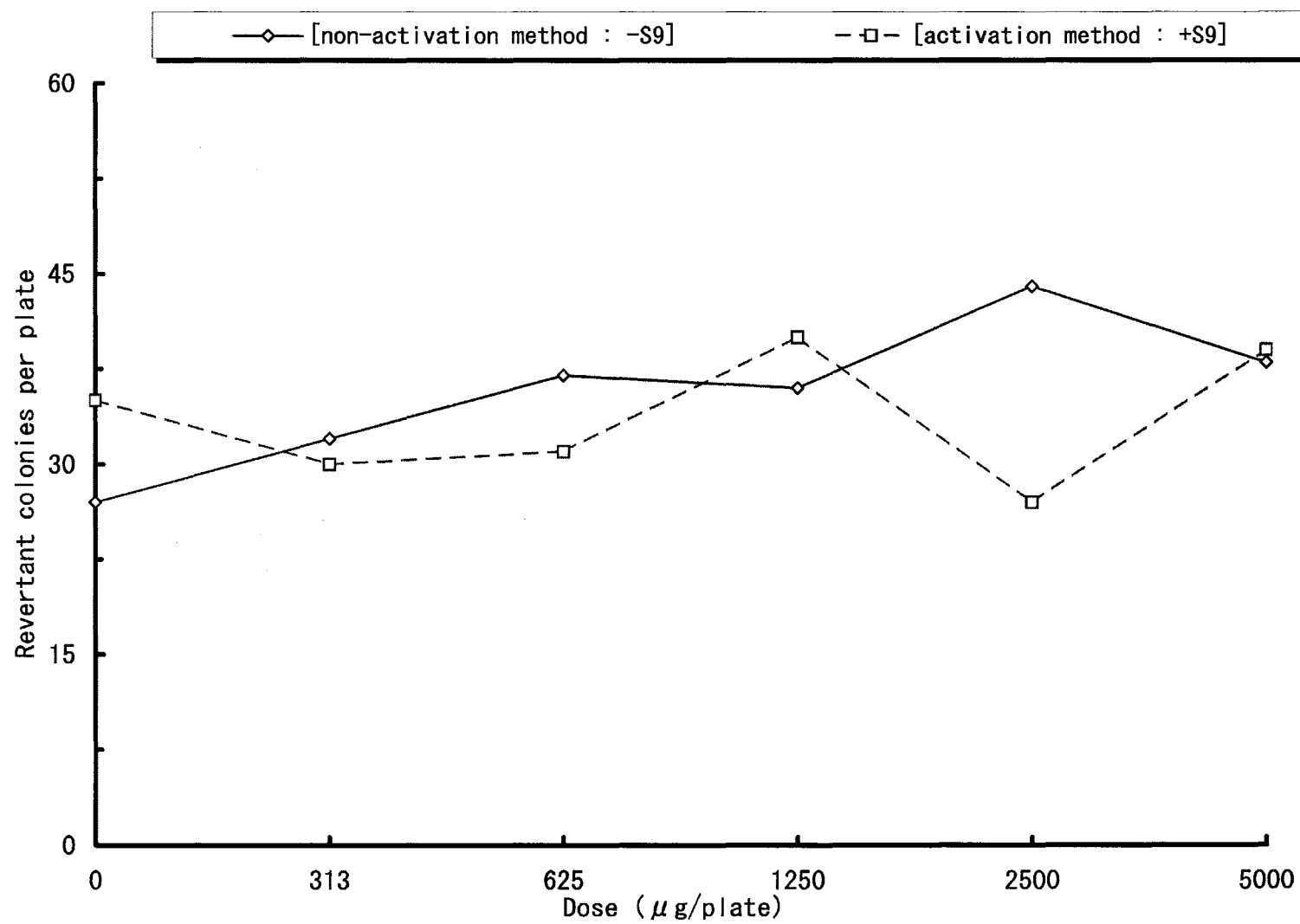


Figure 9. Bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA98

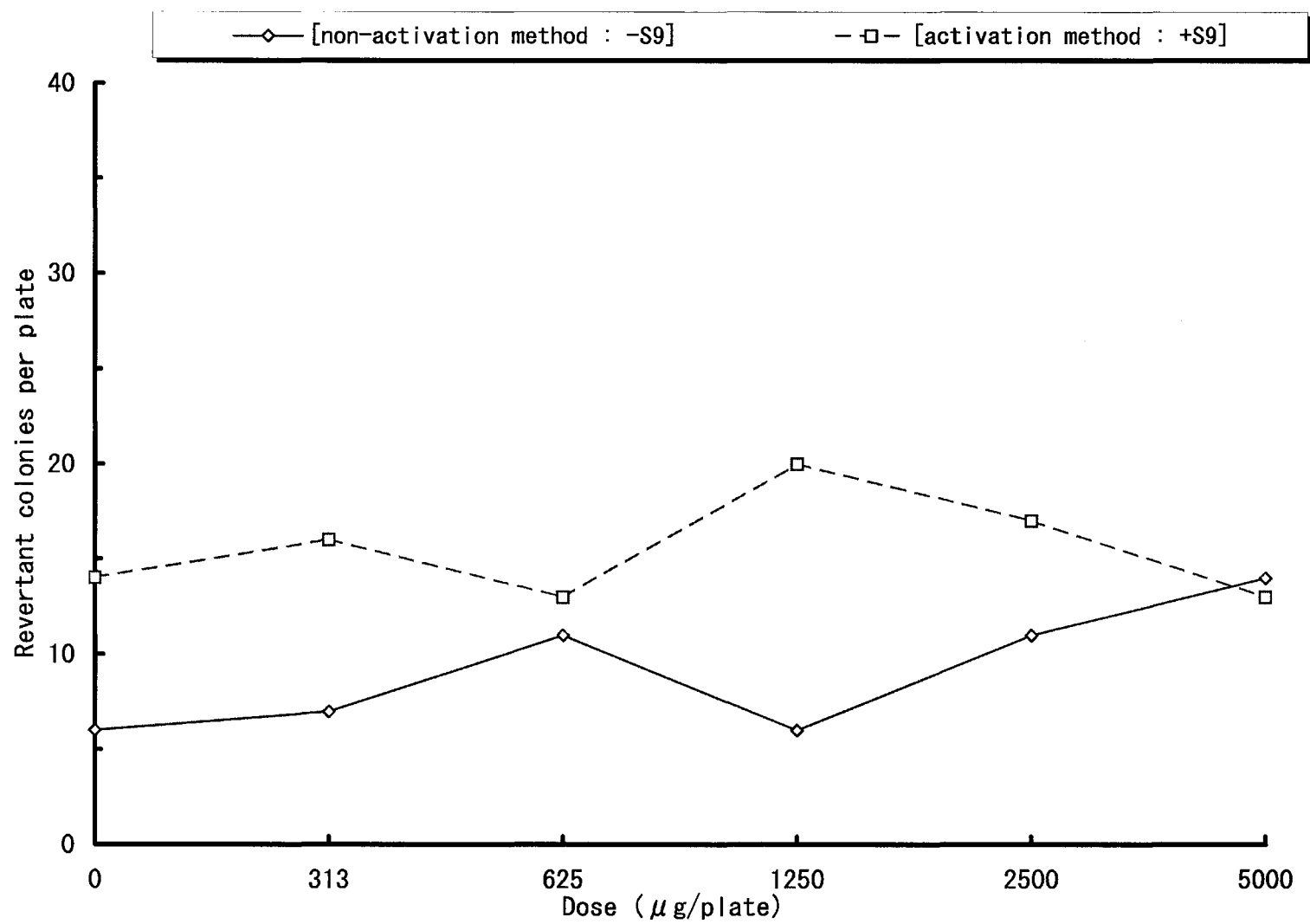


Figure 10. Bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA1537

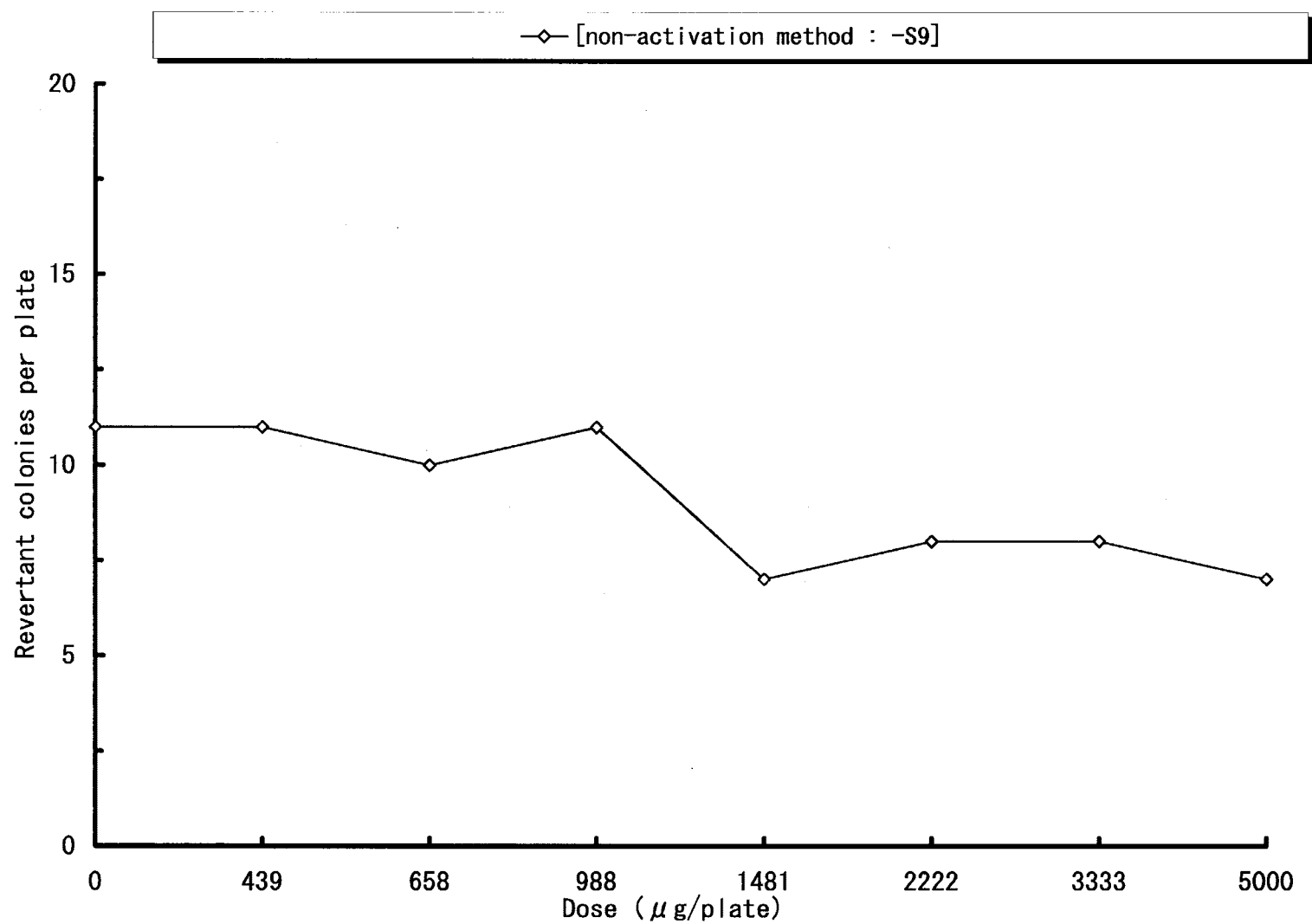


Figure 11. Confirmative examination of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide in strain TA1537

Table 1. Summary data of dose-finding study with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide  
[non-activation method : -S9]

| Compound         | Dose<br>( $\mu$ g/plate) | Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.] |              |                             |                |              |                             |                |              |                             |                |              |                             |                |              |                             |
|------------------|--------------------------|------------------------------------------------|--------------|-----------------------------|----------------|--------------|-----------------------------|----------------|--------------|-----------------------------|----------------|--------------|-----------------------------|----------------|--------------|-----------------------------|
|                  |                          | TA100                                          |              |                             | TA1535         |              |                             | WP2uvrA        |              |                             | TA98           |              |                             | TA1537         |              |                             |
| DMSO             | 0                        | 128<br>[ 115 ]                                 | 107<br>$\pm$ | 111<br>[ 11 ]               | 16<br>[ 13 ]   | 13<br>$\pm$  | 11<br>[ 3 ]                 | 17<br>[ 19 ]   | 16<br>$\pm$  | 23<br>[ 4 ]                 | 25<br>[ 23 ]   | 16<br>$\pm$  | 28<br>[ 6 ]                 | 5<br>[ 10 ]    | 14<br>$\pm$  | 11<br>[ 5 ]                 |
| Test substance   | 2.29                     | 129<br>[ 130 ]                                 | 137<br>$\pm$ | 123<br>[ 7 ]                | 21<br>[ 22 ]   | 25<br>$\pm$  | 20<br>[ 3 ]                 | 22<br>[ 21 ]   | 20<br>$\pm$  | 21<br>[ 1 ]                 | 16<br>[ 16 ]   | 19<br>$\pm$  | 13<br>[ 3 ]                 | 4<br>[ 6 ]     | 9<br>$\pm$   | 6<br>[ 3 ]                  |
|                  | 6.86                     | 156<br>[ 149 ]                                 | 125<br>$\pm$ | 165<br>[ 21 ]               | 39<br>[ 43 ]   | 50<br>$\pm$  | 40<br>[ 6 ]                 | 25<br>[ 22 ]   | 20<br>$\pm$  | 21<br>[ 3 ]                 | 20<br>[ 21 ]   | 21<br>$\pm$  | 23<br>[ 2 ]                 | 8<br>[ 6 ]     | 7<br>$\pm$   | 4<br>[ 2 ]                  |
|                  | 20.6                     | 190<br>[ 196 ]                                 | 201<br>$\pm$ | 198<br>[ 6 ]                | 111<br>[ 120 ] | 131<br>$\pm$ | 118<br>[ 10 ]               | 27<br>[ 22 ]   | 17<br>$\pm$  | 21<br>[ 5 ]                 | 22<br>[ 25 ]   | 23<br>$\pm$  | 31<br>[ 5 ]                 | 9<br>[ 10 ]    | 8<br>$\pm$   | 14<br>[ 3 ]                 |
|                  | 61.7                     | 317<br>[ 309 ]                                 | 290<br>$\pm$ | 319<br>[ 16 ]               | 236<br>[ 225 ] | 199<br>$\pm$ | 239<br>[ 22 ]               | 31<br>[ 27 ]   | 27<br>$\pm$  | 22<br>[ 5 ]                 | 25<br>[ 23 ]   | 19<br>$\pm$  | 24<br>[ 3 ]                 | 13<br>[ 10 ]   | 13<br>$\pm$  | 4<br>[ 5 ]                  |
|                  | 185                      | 494<br>[ 478 ]                                 | 467<br>$\pm$ | 474<br>[ 14 ]               | 372<br>[ 349 ] | 363<br>$\pm$ | 312<br>[ 32 ]               | 24<br>[ 30 ]   | 35<br>$\pm$  | 32<br>[ 6 ]                 | 17<br>[ 23 ]   | 29<br>$\pm$  | 24<br>[ 6 ]                 | 12<br>[ 8 ]    | 8<br>$\pm$   | 5<br>[ 4 ]                  |
|                  | 556                      | 522<br>[ 538 ]                                 | 589<br>$\pm$ | 502<br>[ 46 ]               | 375<br>[ 351 ] | 333<br>$\pm$ | 346<br>[ 22 ]               | 74<br>[ 97 ]   | 111<br>$\pm$ | 107<br>[ 20 ]               | 29<br>[ 27 ]   | 21<br>$\pm$  | 30<br>[ 5 ]                 | 12<br>[ 10 ]   | 4<br>$\pm$   | 14<br>[ 5 ]                 |
|                  | 1667 +                   | 535<br>[ 527 ]                                 | 525<br>$\pm$ | 521<br>[ 7 ]                | 297<br>[ 274 ] | 261<br>$\pm$ | 264<br>[ 20 ]               | 156<br>[ 170 ] | 181<br>$\pm$ | 174<br>[ 13 ]               | 25<br>[ 31 ]   | 29<br>$\pm$  | 39<br>[ 7 ]                 | 4<br>[ 7 ]     | 7<br>$\pm$   | 9<br>[ 3 ]                  |
|                  | 5000 +                   | 291<br>[ 304 ]                                 | 272<br>$\pm$ | 350<br>[ 41 ]               | 167<br>[ 167 ] | 166<br>$\pm$ | 167<br>[ 1 ]                | 131<br>[ 132 ] | 127<br>$\pm$ | 139<br>[ 6 ]                | 28<br>[ 28 ]   | 27<br>$\pm$  | 28<br>[ 1 ]                 | 12<br>[ 10 ]   | 12<br>$\pm$  | 5<br>[ 4 ]                  |
| Positive control |                          | 657<br>[ 627 ]                                 | 584<br>$\pm$ | 641 <sup>a)</sup><br>[ 38 ] | 449<br>[ 467 ] | 507<br>$\pm$ | 445 <sup>b)</sup><br>[ 35 ] | 171<br>[ 167 ] | 154<br>$\pm$ | 175 <sup>a)</sup><br>[ 11 ] | 621<br>[ 644 ] | 654<br>$\pm$ | 658 <sup>c)</sup><br>[ 20 ] | 203<br>[ 225 ] | 214<br>$\pm$ | 257 <sup>d)</sup><br>[ 29 ] |

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

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

Table 2. Summary data of dose-finding study with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide  
[activation method : +S9]

| Compound         | Dose<br>( $\mu$ g/plate) | Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.] |              |                           |              |              |                           |                     |              |                           |              |              |                           |              |              |                           |
|------------------|--------------------------|------------------------------------------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------------|---------------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------------|
|                  |                          | TA100                                          |              |                           | TA1535       |              |                           | WP2 <sub>uvrA</sub> |              |                           | TA98         |              |                           | TA1537       |              |                           |
| DMSO             | 0                        | 111<br>[ 110                                   | 111<br>$\pm$ | 109<br>1 ]                | 11<br>[ 13   | 13<br>$\pm$  | 15<br>2 ]                 | 23<br>[ 23          | 26<br>$\pm$  | 19<br>4 ]                 | 36<br>[ 30   | 32<br>$\pm$  | 23<br>7 ]                 | 16<br>[ 18   | 23<br>$\pm$  | 16<br>4 ]                 |
| Test substance   | 2.29                     | 142<br>[ 139                                   | 137<br>$\pm$ | 138<br>3 ]                | 28<br>[ 33   | 33<br>$\pm$  | 38<br>5 ]                 | 29<br>[ 22          | 17<br>$\pm$  | 19<br>6 ]                 | 29<br>[ 33   | 31<br>$\pm$  | 40<br>6 ]                 | 22<br>[ 20   | 24<br>$\pm$  | 15<br>5 ]                 |
|                  | 6.86                     | 137<br>[ 148                                   | 151<br>$\pm$ | 156<br>10 ]               | 59<br>[ 65   | 73<br>$\pm$  | 62<br>7 ]                 | 17<br>[ 22          | 26<br>$\pm$  | 22<br>5 ]                 | 27<br>[ 33   | 34<br>$\pm$  | 38<br>6 ]                 | 22<br>[ 19   | 19<br>$\pm$  | 16<br>3 ]                 |
|                  | 20.6                     | 219<br>[ 219                                   | 201<br>$\pm$ | 236<br>18 ]               | 180<br>[ 177 | 188<br>$\pm$ | 163<br>13 ]               | 24<br>[ 22          | 23<br>$\pm$  | 20<br>2 ]                 | 37<br>[ 28   | 23<br>$\pm$  | 23<br>8 ]                 | 15<br>[ 14   | 11<br>$\pm$  | 15<br>2 ]                 |
|                  | 61.7                     | 344<br>[ 333                                   | 341<br>$\pm$ | 315<br>16 ]               | 329<br>[ 344 | 327<br>$\pm$ | 377<br>28 ]               | 17<br>[ 26          | 31<br>$\pm$  | 29<br>8 ]                 | 35<br>[ 30   | 29<br>$\pm$  | 27<br>4 ]                 | 15<br>[ 20   | 21<br>$\pm$  | 24<br>5 ]                 |
|                  | 185                      | 410<br>[ 412                                   | 414<br>$\pm$ | 411<br>2 ]                | 523<br>[ 527 | 501<br>$\pm$ | 558<br>29 ]               | 36<br>[ 34          | 30<br>$\pm$  | 36<br>3 ]                 | 20<br>[ 28   | 31<br>$\pm$  | 34<br>7 ]                 | 14<br>[ 18   | 20<br>$\pm$  | 20<br>3 ]                 |
|                  | 556                      | 355<br>[ 381                                   | 408<br>$\pm$ | 381<br>27 ]               | 473<br>[ 483 | 483<br>$\pm$ | 493<br>10 ]               | 70<br>[ 71          | 64<br>$\pm$  | 80<br>8 ]                 | 21<br>[ 28   | 35<br>$\pm$  | 29<br>7 ]                 | 21<br>[ 18   | 16<br>$\pm$  | 16<br>3 ]                 |
|                  | 1667 +                   | 385<br>[ 375                                   | 381<br>$\pm$ | 360<br>13 ]               | 378<br>[ 361 | 359<br>$\pm$ | 347<br>16 ]               | 151<br>[ 146        | 145<br>$\pm$ | 142<br>5 ]                | 32<br>[ 38   | 43<br>$\pm$  | 38<br>6 ]                 | 25<br>[ 23   | 20<br>$\pm$  | 24<br>3 ]                 |
|                  | 5000 +                   | 314<br>[ 304                                   | 301<br>$\pm$ | 298<br>9 ]                | 292<br>[ 292 | 292<br>$\pm$ | 291<br>1 ]                | 195<br>[ 193        | 192<br>$\pm$ | 193<br>2 ]                | 46<br>[ 42   | 41<br>$\pm$  | 38<br>4 ]                 | 13<br>[ 14   | 13<br>$\pm$  | 16<br>2 ]                 |
| Positive control |                          | 800<br>[ 801                                   | 782<br>$\pm$ | 820 <sup>a)</sup><br>19 ] | 320<br>[ 294 | 291<br>$\pm$ | 271 <sup>b)</sup><br>25 ] | 745<br>[ 742        | 721<br>$\pm$ | 760 <sup>c)</sup><br>20 ] | 410<br>[ 383 | 361<br>$\pm$ | 377 <sup>d)</sup><br>25 ] | 150<br>[ 144 | 153<br>$\pm$ | 128 <sup>b)</sup><br>14 ] |

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

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

Table 3. Results of the bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide  
[non-activation method : -S9]

| Compound         | Dose<br>( $\mu$ g/plate) | Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.] |              |                           |              |              |                          |              |              |                           |              |              |                          |              |              |                           |
|------------------|--------------------------|------------------------------------------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------------------|--------------|--------------|---------------------------|
|                  |                          | TA100                                          |              |                           | TA1535       |              |                          | WP2 $uvrA$   |              |                           | TA98         |              |                          | TA1537       |              |                           |
| DMSO             | 0                        | 131<br>[ 115                                   | 97<br>$\pm$  | 118<br>17 ]               | 14<br>[ 14   | 14<br>$\pm$  | 14<br>0 ]                | 22<br>[ 15   | 14<br>$\pm$  | 10<br>6 ]                 | 29<br>[ 27   | 32<br>$\pm$  | 20<br>6 ]                | 6<br>[ 6     | 6<br>$\pm$   | 5<br>1 ]                  |
| Test substance   | 2.44                     |                                                |              |                           | 21<br>[ 21   | 18<br>$\pm$  | 23<br>3 ]                |              |              |                           |              |              |                          |              |              |                           |
|                  | 4.88                     | 157<br>[ 143                                   | 135<br>$\pm$ | 136<br>12 ]               | 31<br>[ 35   | 39<br>$\pm$  | 34<br>4 ]                |              |              |                           |              |              |                          |              |              |                           |
|                  | 9.77                     | 139<br>[ 146                                   | 161<br>$\pm$ | 139<br>13 ]               | 56<br>[ 53   | 46<br>$\pm$  | 56<br>6 ]                |              |              |                           |              |              |                          |              |              |                           |
|                  | 19.5                     | 179<br>[ 191                                   | 186<br>$\pm$ | 207<br>15 ]               | 97<br>[ 89   | 92<br>$\pm$  | 78<br>10 ]               |              |              |                           |              |              |                          |              |              |                           |
|                  | 39.1                     | 232<br>[ 246                                   | 256<br>$\pm$ | 249<br>12 ]               | 160<br>[ 139 | 116<br>$\pm$ | 141<br>22 ]              | 25<br>[ 25   | 24<br>$\pm$  | 25<br>1 ]                 |              |              |                          |              |              |                           |
|                  | 78.1                     | 323<br>[ 327                                   | 311<br>$\pm$ | 347<br>18 ]               | 184<br>[ 209 | 225<br>$\pm$ | 217<br>22 ]              | 15<br>[ 21   | 21<br>$\pm$  | 28<br>7 ]                 |              |              |                          |              |              |                           |
|                  | 156                      | 464<br>[ 443                                   | 450<br>$\pm$ | 415<br>25 ]               |              |              |                          | 24<br>[ 27   | 31<br>$\pm$  | 25<br>4 ]                 |              |              |                          |              |              |                           |
|                  | 313                      |                                                |              |                           |              |              |                          | 68<br>[ 62   | 59<br>$\pm$  | 59<br>5 ]                 | 33<br>[ 32   | 30<br>$\pm$  | 32<br>2 ]                | 6<br>[ 7     | 7<br>$\pm$   | 8<br>1 ]                  |
|                  | 625                      |                                                |              |                           |              |              |                          | 98<br>[ 96   | 96<br>$\pm$  | 95<br>2 ]                 | 35<br>[ 37   | 45<br>$\pm$  | 30<br>8 ]                | 7<br>[ 11    | 14<br>$\pm$  | 12<br>4 ]                 |
|                  | 1250                     |                                                |              |                           |              |              |                          | 118<br>[ 124 | 128<br>$\pm$ | 125<br>5 ]                | 40<br>[ 36   | 32<br>$\pm$  | 36<br>4 ]                | 8<br>[ 6     | 8<br>$\pm$   | 3<br>3 ]                  |
|                  | 2500 +                   |                                                |              |                           |              |              |                          |              |              |                           | 53<br>[ 44   | 51<br>$\pm$  | 27<br>14 ]               | 11<br>[ 11   | 9<br>$\pm$   | 12<br>2 ]                 |
|                  | 5000 +                   |                                                |              |                           |              |              |                          |              |              |                           | 40<br>[ 38   | 34<br>$\pm$  | 39<br>3 ]                | 11<br>[ 14   | 20<br>$\pm$  | 12<br>5 ]                 |
| Positive control |                          | 754<br>[ 734                                   | 737<br>$\pm$ | 712 <sup>a)</sup><br>21 ] | 459<br>[ 459 | 462<br>$\pm$ | 457 <sup>b)</sup><br>3 ] | 202<br>[ 173 | 153<br>$\pm$ | 164 <sup>a)</sup><br>26 ] | 653<br>[ 644 | 641<br>$\pm$ | 639 <sup>c)</sup><br>8 ] | 181<br>[ 196 | 218<br>$\pm$ | 190 <sup>d)</sup><br>19 ] |

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

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



Table 4. Results of the bacterial reversion assay of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide  
[activation method : +S9]

| Compound         | Dose<br>( $\mu$ g/plate) | Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.] |              |                           |              |              |                           |              |              |                           |              |              |                           |              |              |                           |
|------------------|--------------------------|------------------------------------------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------------|
|                  |                          | TA100                                          |              |                           | TA1535       |              |                           | WP2uvrA      |              |                           | TA98         |              |                           | TA1537       |              |                           |
| DMSO             | 0                        | 118<br>[ 113                                   | 110<br>$\pm$ | 110<br>5 ]                | 4<br>[ 9     | 12<br>$\pm$  | 11<br>4 ]                 | 17<br>[ 20   | 23<br>$\pm$  | 19<br>3 ]                 | 29<br>[ 35   | 39<br>$\pm$  | 38<br>6 ]                 | 14<br>[ 14   | 12<br>$\pm$  | 16<br>2 ]                 |
| Test substance   | 0.610                    |                                                |              |                           | 8<br>[ 17    | 23<br>$\pm$  | 19<br>8 ]                 |              |              |                           |              |              |                           |              |              |                           |
|                  | 1.22                     |                                                |              |                           | 24<br>[ 21   | 24<br>$\pm$  | 14<br>6 ]                 |              |              |                           |              |              |                           |              |              |                           |
|                  | 2.44                     |                                                |              |                           | 28<br>[ 30   | 30<br>$\pm$  | 33<br>3 ]                 |              |              |                           |              |              |                           |              |              |                           |
|                  | 4.88                     | 141<br>[ 140                                   | 114<br>$\pm$ | 166<br>26 ]               | 67<br>[ 65   | 67<br>$\pm$  | 61<br>3 ]                 |              |              |                           |              |              |                           |              |              |                           |
|                  | 9.77                     | 149<br>[ 173                                   | 185<br>$\pm$ | 186<br>21 ]               | 104<br>[ 105 | 106<br>$\pm$ | 104<br>1 ]                |              |              |                           |              |              |                           |              |              |                           |
|                  | 19.5                     | 192<br>[ 220                                   | 218<br>$\pm$ | 249<br>29 ]               | 157<br>[ 164 | 177<br>$\pm$ | 159<br>11 ]               |              |              |                           |              |              |                           |              |              |                           |
|                  | 39.1                     | 264<br>[ 283                                   | 282<br>$\pm$ | 304<br>20 ]               |              |              |                           | 21<br>[ 22   | 27<br>$\pm$  | 17<br>5 ]                 |              |              |                           |              |              |                           |
|                  | 78.1                     | 362<br>[ 337                                   | 335<br>$\pm$ | 315<br>24 ]               |              |              |                           | 28<br>[ 27   | 36<br>$\pm$  | 16<br>10 ]                |              |              |                           |              |              |                           |
|                  | 156                      | 414<br>[ 385                                   | 372<br>$\pm$ | 369<br>25 ]               |              |              |                           | 36<br>[ 32   | 29<br>$\pm$  | 30<br>4 ]                 |              |              |                           |              |              |                           |
|                  | 313                      |                                                |              |                           |              |              |                           | 38<br>[ 37   | 29<br>$\pm$  | 43<br>7 ]                 | 36<br>[ 30   | 34<br>$\pm$  | 20<br>9 ]                 | 19<br>[ 16   | 17<br>$\pm$  | 12<br>4 ]                 |
|                  | 625                      |                                                |              |                           |              |              |                           | 63<br>[ 63   | 68<br>$\pm$  | 57<br>6 ]                 | 26<br>[ 31   | 31<br>$\pm$  | 37<br>6 ]                 | 18<br>[ 13   | 9<br>$\pm$   | 12<br>5 ]                 |
|                  | 1250                     |                                                |              |                           |              |              |                           | 93<br>[ 107  | 118<br>$\pm$ | 110<br>13 ]               | 34<br>[ 40   | 50<br>$\pm$  | 37<br>9 ]                 | 21<br>[ 20   | 22<br>$\pm$  | 18<br>2 ]                 |
|                  | 2500 +                   |                                                |              |                           |              |              |                           |              |              |                           | 33<br>[ 27   | 18<br>$\pm$  | 29<br>8 ]                 | 21<br>[ 17   | 13<br>$\pm$  | 17<br>4 ]                 |
|                  | 5000 +                   |                                                |              |                           |              |              |                           |              |              |                           | 46<br>[ 39   | 32<br>$\pm$  | 38<br>7 ]                 | 12<br>[ 13   | 16<br>$\pm$  | 12<br>2 ]                 |
| Positive control |                          | 929<br>[ 920                                   | 927<br>$\pm$ | 905 <sup>a)</sup><br>13 ] | 283<br>[ 268 | 270<br>$\pm$ | 250 <sup>b)</sup><br>17 ] | 729<br>[ 659 | 631<br>$\pm$ | 618 <sup>c)</sup><br>61 ] | 391<br>[ 414 | 434<br>$\pm$ | 418 <sup>d)</sup><br>22 ] | 157<br>[ 149 | 127<br>$\pm$ | 163 <sup>b)</sup><br>19 ] |

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

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

Table 5. Results of the confirmative examination of Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide  
[non-activation method : -S9]

| Compound         | Dose<br>( $\mu$ g/plate) | Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.] |              |                           |
|------------------|--------------------------|------------------------------------------------|--------------|---------------------------|
|                  |                          | TA1537                                         |              |                           |
| DMSO             | 0                        | 15<br>[ 11                                     | 11<br>$\pm$  | 6<br>5 ]                  |
| Test substance   | 439                      | 12<br>[ 11                                     | 11<br>$\pm$  | 11<br>1 ]                 |
|                  | 658                      | 13<br>[ 10                                     | 8<br>$\pm$   | 8<br>3 ]                  |
|                  | 988                      | 9<br>[ 11                                      | 14<br>$\pm$  | 11<br>3 ]                 |
|                  | 1481                     | 4<br>[ 7                                       | 12<br>$\pm$  | 5<br>4 ]                  |
|                  | 2222 +                   | 9<br>[ 8                                       | 7<br>$\pm$   | 9<br>1 ]                  |
|                  | 3333 +                   | 7<br>[ 8                                       | 6<br>$\pm$   | 11<br>3 ]                 |
|                  | 5000 +                   | 9<br>[ 7                                       | 8<br>$\pm$   | 4<br>3 ]                  |
| Positive control |                          | 277<br>[ 232                                   | 201<br>$\pm$ | 219 <sup>a)</sup><br>40 ] |

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

a): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu$ g/plate