最 終 報 告 書

2-エチルアントラキノンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：4183（ 115－101 ）

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 8
13. 試験結果 16
14. 考察および結論 18
15. 参考文献 19

Figures F-1~6
Figure 1 Bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain TA100 F-1
Figure 2 Bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain TA1535 F-2
Figure 3 Bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain WP2*uvrA* F-3
Figure 4 Bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain TA98 F-4
Figure 5 Bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain TA1537 F-5
Figure 6 Confirmative examination of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain TA100 F-6

Tables		T-1~6
Table 1	Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (1st trial) [direct method : -S9]	T-1
Table 2	Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (1st trial) [activation method : +S9]	T-2
Table 3	Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (2nd trial) [direct method : -S9]	T-3
Table 4	Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (2nd trial) [activation method : +S9]	T-4
Table 5	Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (confirmative examination : 1st) [activation method : +S9]	T-5
Table 6	Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (confirmative examination : 2nd) [activation method : +S9]	T-6

1. 要約

本試験条件下において，2-エチルアントラキノン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.

2-エチルアントラキノン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，2-エチルアントラキノン処理では+S9 処理の TA100 においてのみ僅かな復帰突然変異コロニー数の増加がみられたが，確認試験等を実施した結果，再現性のある陽性結果は得られなかった.
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

2-エチルアントラキノン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

2-エチルアントラキノン

(2-Alkyl(C=2)anthraquinone)

11.2. ロット番号

11.3. 純度

99.16 wt%

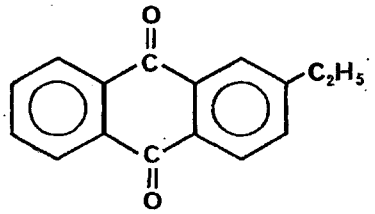
11.4. 保管条件

直射日光が当たらないように保管する.

11.5. CAS 番号

84-51-5

11.6. 構造式または示性式



11.7. 分子量

236.2

11.8. 不純物の名称及び濃度

アントラキノン ：0.01%

硫黄分：1.4 ppm

塩素分：14.3 ppm

11.9. 常温における性状

固体，淡黄色フレーク

11.10. 融点

108～111℃

11.11. 沸点

245℃/20 mmHg

11.12. 溶媒に対する溶解度等

水：ほとんど溶けない

DMSO：可溶

アセトン ：可溶

11.13. 安定性

水との反応性 ：なし

発火性：なし

酸化性：なし

11.14. 取り扱い上の注意

吸い込んだり，直接皮膚に触れないよう適切な保護具を着用する．

11.15. 残余被験物質料の処理

被験物質の残余は，染色体異常試験（試験番号 4184）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 *uvrA*	(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日ならびに平成11年6月29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；三洋電機メディカシステム株式会社）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1月19日製造，Lot No. AN040AO）を試験に使用した．本プレートは，Vogel-Bonner最少培地Eを含む溶液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）

寒天（Bacto-agar：Difco Laboratories；Lot No. 120535JD）0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム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【1および2回目】，911S1877【確認1および2回目】）－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 のバッ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 μL 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℃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℃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次に示した.

試験	試験生菌数（×10^9／mL）				
	TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
本試験1回目	3.31	3.54	3.81	2.91	1.91
本試験2回目	3.99	3.76	3.56	3.66	2.22
確認試験1回目	3.60	-	-	-	-
確認試験2回目	3.89	-	-	-	-

12.4. S 9 mix

製造後6ヵ月以内のS9 mix（キッコーマン株式会社；Lot No. FSM-397）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-397
b. 調製日　平成11年2月5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　192～237g
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　25.4 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
KCl	33	μmol
$MgCl_2$	8	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

本被験物質は水に不溶, DMSO に可溶であることから被験物質を DMSO（Lot No. K24605778 830）に懸濁（5000 μg／プレートのみ）あるいは溶解させ調製原液とした. 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. モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO を被験物質の調製に使用した.

12.6. 対照群

12.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒のみで試験した.

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 803）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℃）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_3　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_3	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 *uvrA*)

《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 *uvrA*)

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ー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 にトップアガーをそれぞれ 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.

2-エチルアントラキノン調製原液ならびに 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 (μg／プレート)	S9 Mix	復帰突然変異コロニー数				
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
0	-	105	13	24	16	6
19.5	-	114	7	24	27	6
78.1	-	129	10	28	28	5
313	-	122	4	16	23	5
1250	-	123	8	21	19	3
0	+	100	14	18	36	11
19.5	+	182	21	33	44	23
78.1	+	223	17	34	40	13
313	+	177	11	30	36	9
1250	+	173	9	27	31	7

いずれの試験菌株とも生育阻害作用は観察されなかった. 復帰突然変異コロニー数については代謝活性化法+S9 処理の TA100, WP2 *uvrA* および TA1537 で僅かに増加する傾向がみられた. 従って, これら 3 菌株を用いて追加試験を実施した. 2 プレートの平均値を以下に示す.

試験用量 (μg／プレート)	S9 Mix	復帰突然変異コロニー数				
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
0	-	97	-	23	-	12
2.50	-	-	-	-	-	12
5.00	-	122	-	33	-	14
10.0	-	167	-	28	-	18
20.0	-	188	-	24	-	19
40.0	-	175	-	29	-	13
80.0	-	160	-	35	-	-
160	-	130	-	24	-	-

TA100 においてのみ僅かではあるが試験用量に依存した復帰突然変異コロニーの増加傾向が観察された．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6～8 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（μg／プレート）				
	TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
直接法	5000	5000	5000	5000	5000
代謝活性化法	156	5000	5000	5000	5000

代謝活性化法の TA100 における低用量域での陽性反応確認および高用量域での変異原性の有無を確認するため，確認試験 1 回目では 2.44～5000 μg／プレートの計 12 用量（公比 2）を，確認試験 2 回目では 156～5000 μg／プレートの計 6 用量（公比 2）を設定した．

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 μL，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 μL，代謝活性化法の場合，S9 mix を 500 μL 分注した．さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 μL を加えた後，振盪恒温器（M-100^{N}：タイテック株式会社）を用いて 37℃で 20 分間振盪（プレインキュベーション）した．振盪終了後，トップアガーを 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℃の条件で 48 時間各プレートを培養した．

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の生育状態について実体顕微鏡（×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．なお，本試験 1 回目，同 2 回目，確認試験 1 回目および同 2 回目とも，156 μg／プレート以上では被験物質の析出によりコロニーアナライザーの使用が不適当と判断したため，目視でコロニーを計数した．

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.

2-エチルアントラキノン処理群の場合，直接法ならびに代謝活性化法のいずれの試験用量においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった.

復帰突然変異コロニー数については直接法の場合，陰性対照と同等の値であったが，代謝活性化法の TA100 では増加傾向が認められ，コロニー誘発の極大では陰性対照値の 1.92 倍を示した.

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，直接法および代謝活性化法とも 156 μg／プレート以上の用量で粉末状等の析出物が，5000 μg／プレートでは懸濁液処理による残存物がプレート表面に観察された.

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，直接法ならびに代謝活性化法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．復帰突然変異コロニー数については，直接法の場合，陰性対照と同等の値であったが，代謝活性化法の TA100 では僅かな増加傾向が認められ，誘発の最大で陰性対照値の 1.60 倍であった.

た.

なお，コロニー計数時，直接法および代謝活性化法とも 156 μg／プレート以上の用量で粉末状等の析出物が，5000 μg／プレートでは懸濁液処理による残存物がプレート表面に観察された.

13.3. 確認試験結果（1 回目）

代謝活性化法の TA100 株について低用量域での復帰突然変異コロニーの増加傾向の再現性を確認すること，ならびに高用量域での変異原性の有無を調べるため，確認試験を実施した.

試験結果を Figure 6 および Table 5 に示した.

低用量域で復帰突然変異コロニーの僅かな増加傾向がみられたが，陰性対照値の 2 倍を超えることはなかった．また，5000 μg／プレートを最高用量とした高用量域においては復帰突然変異コロニーの増加傾向は観察されなかった.

なお，コロニー計数時，156 μg／プレート以上の用量で粉末状等の析出物が，5000 μg／プレートでは懸濁液処理による残存物がプレート表面に観察された.

13.4. 確認試験結果（2回目）

代謝活性化法のTA100株について試験結果の再現性を調べるため，156～5000 μg／プレートの6用量について確認試験を実施した．

試験結果をFigure 6およびTable 6に示した．

被験物質処理群のいずれの用量においても復帰突然変異コロニーの増加傾向は観察されなかった．

なお，コロニー計数時，156 μg／プレート以上の用量で粉末状等の析出物が，5000 μg／プレートでは懸濁液処理による残存物がプレート表面に観察された．

以上，本試験および確認試験において，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

2-エチルアントラキノンの変異原性，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 μg／プレートまで検討した．その結果，2-エチルアントラキノン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，本被験物質（2-エチルアントラキノン）の変異原性に関する報告はなかった．類縁体である Anthraquinone については Ames 試験で陽性 [1)]，2-Aminoanthraquinone は染色体異常試験で陽性 [1)]，1,4-Diaminoanthraquinone は Ames 試験および染色体異常試験で陽性 [1)]，1-Aminoanthraquinone は Ames 試験で陽性 [2)]，染色体異常試験で陰性 [2)] との報告があった.

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 2-エチルアントラキノン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.

15. 参考文献

1) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課　監修：労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集，社団法人　日本化学物質安全・情報センター，1996.

2) 厚生省生活衛生局企画課生活科学安全対策室　監修：化学物質毒性試験報告，Vol. 3，化学物質点検推進連絡協議会，1996.

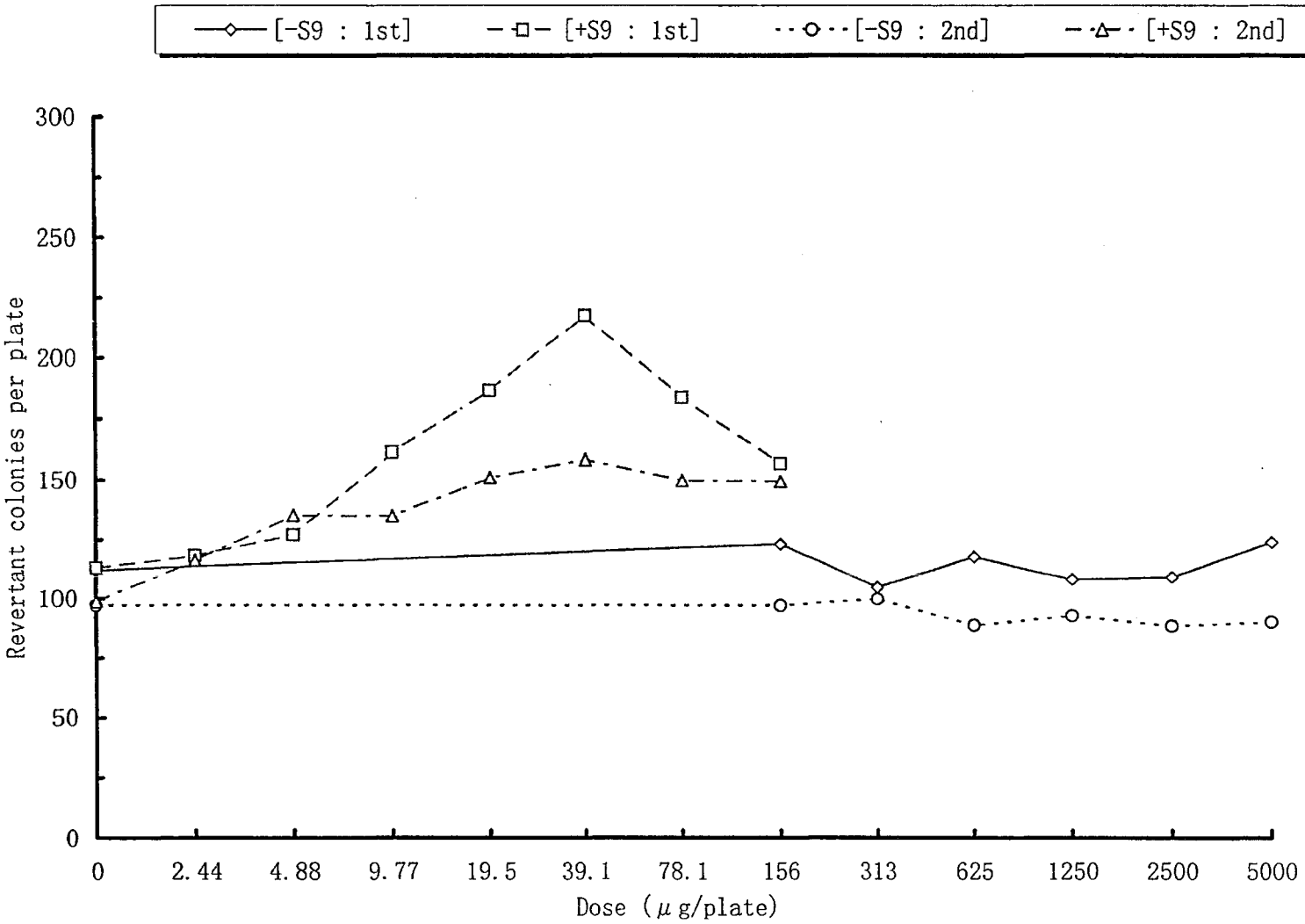


Figure 1. Bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain TA100

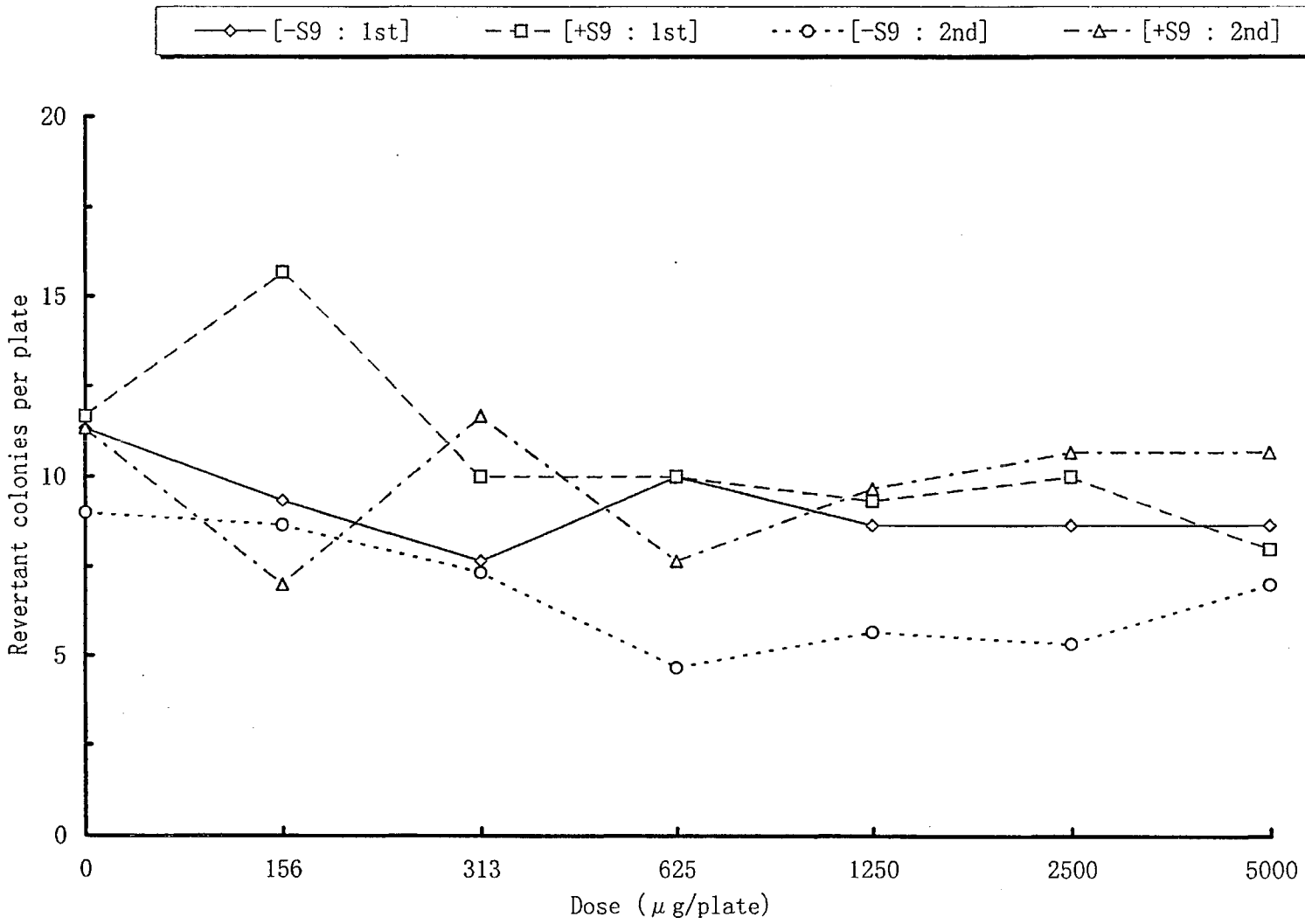


Figure 2. Bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain TA1535

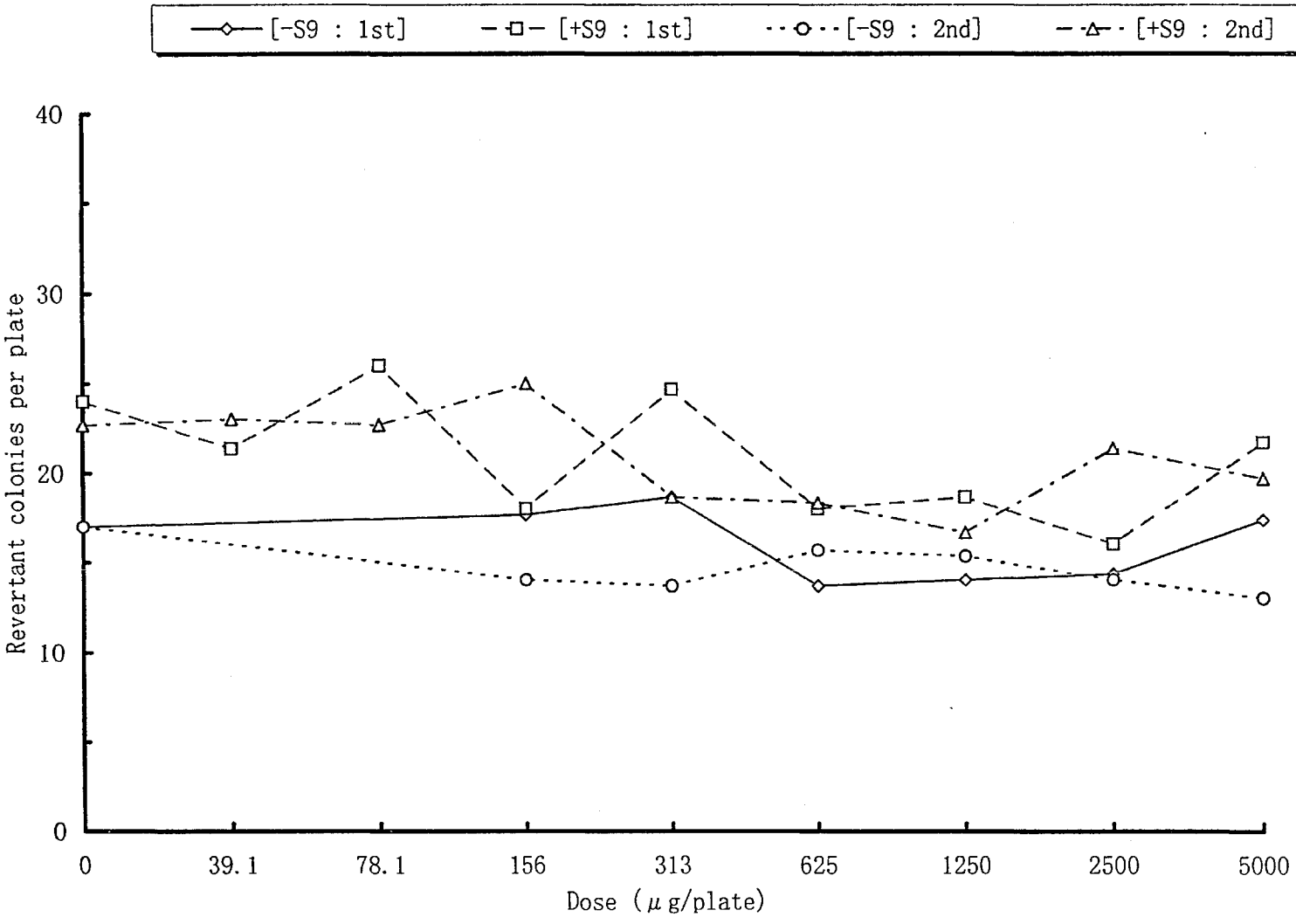


Figure 3. Bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain WP2*uvrA*

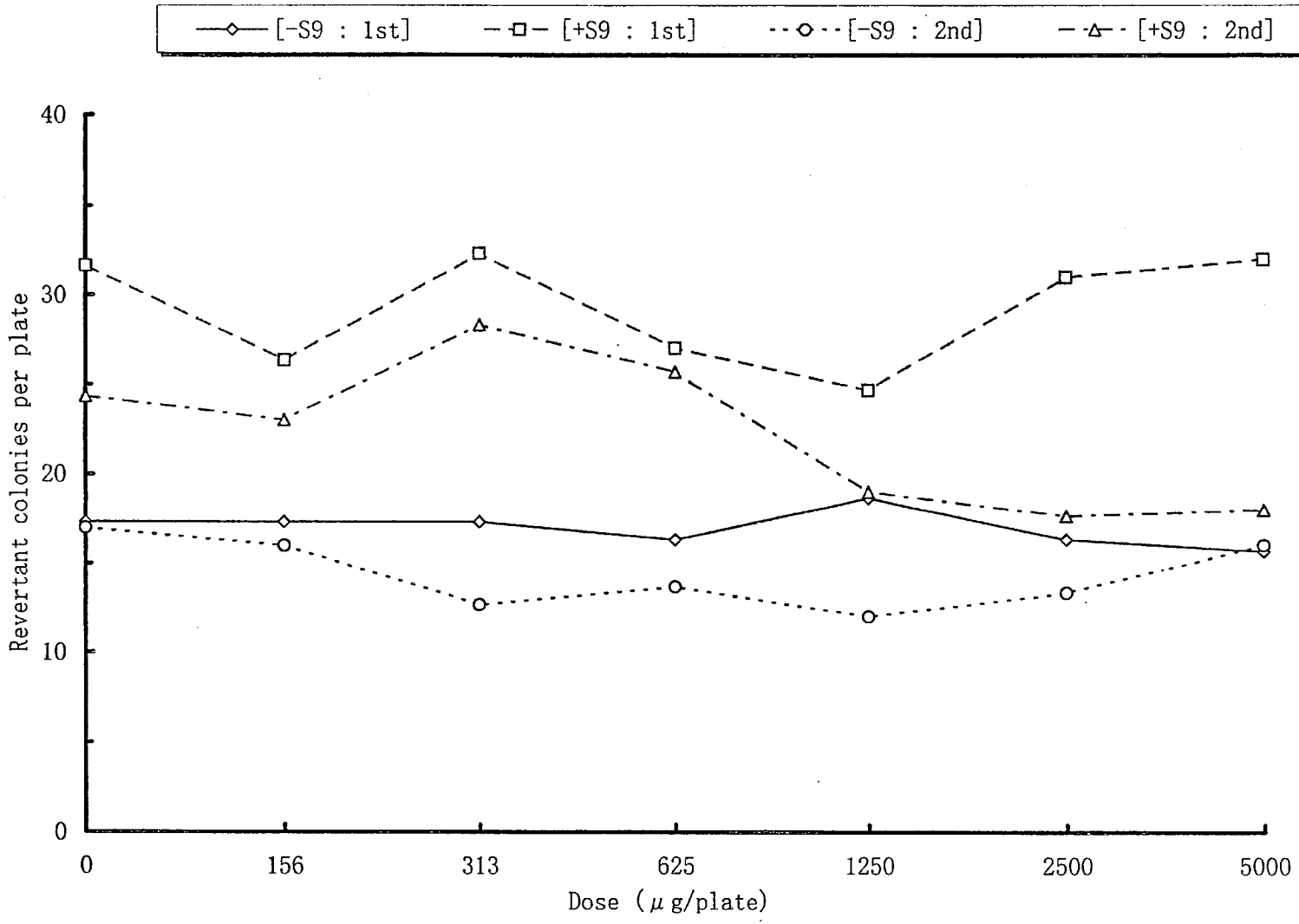


Figure 4. Bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain TA98

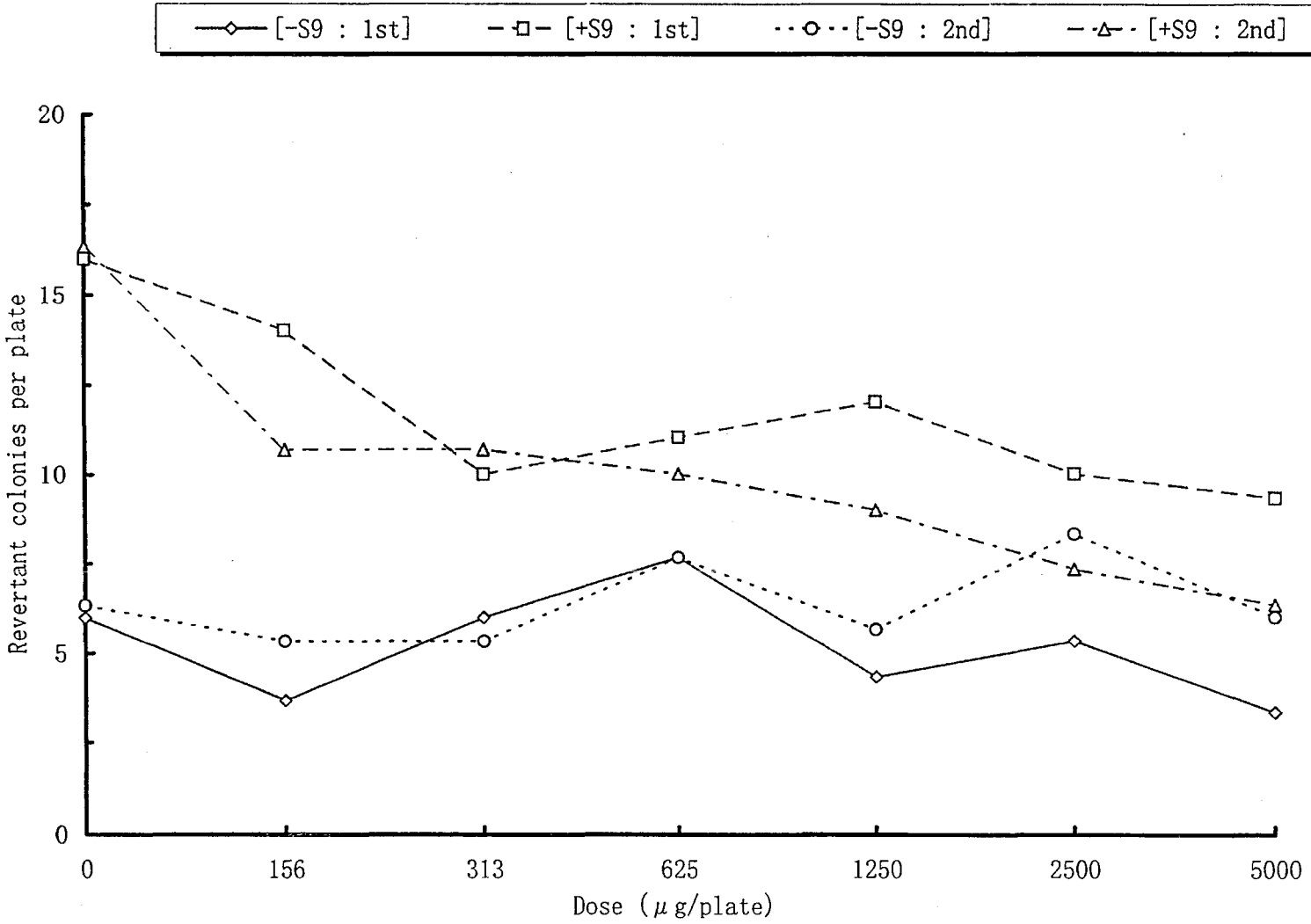


Figure 5. . Bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain TA1537

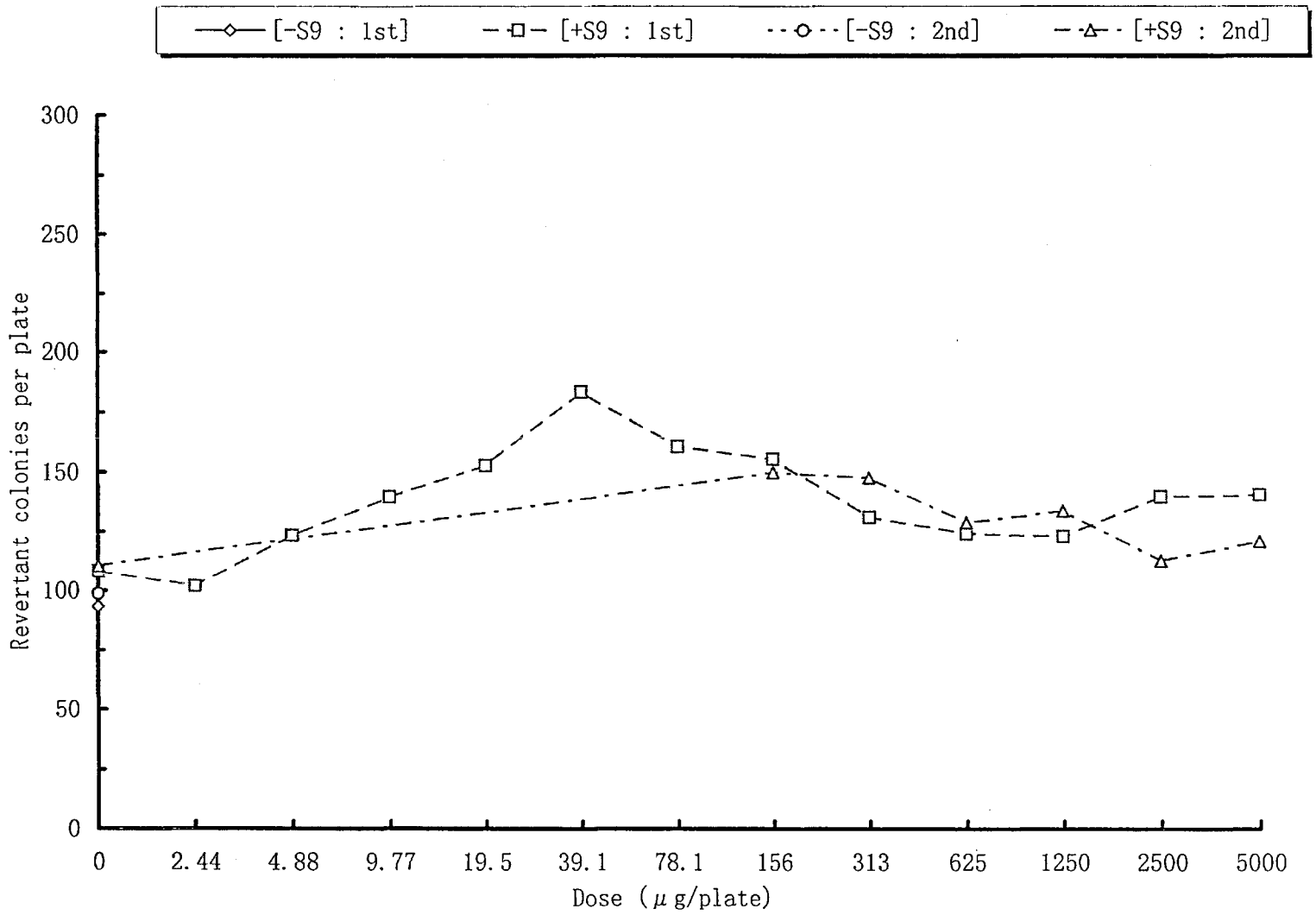


Figure 6. Confirmative examination of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone in strain TA100

Table 1. Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (1st trial) [direct method : -S9]

Exp. No. 4183 (115-101)

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Test substance	0	115 110 111 [112 ± 3]	14 9 11 [11 ± 3]	17 17 17 [17 ± 0]	15 18 19 [17 ± 2]	6 5 7 [6 ± 1]
	156 +	125 122 121 [123 ± 2]	8 7 13 [9 ± 3]	19 19 15 [18 ± 2]	14 19 19 [17 ± 3]	5 4 2 [4 ± 2]
	313 +	106 102 105 [104 ± 2]	6 11 6 [8 ± 3]	20 16 20 [19 ± 2]	19 16 17 [17 ± 2]	5 9 4 [6 ± 3]
	625 +	123 110 119 [117 ± 7]	7 10 13 [10 ± 3]	14 11 16 [14 ± 3]	14 20 15 [16 ± 3]	9 8 6 [8 ± 2]
	1250 +	107 113 103 [108 ± 5]	9 10 7 [9 ± 2]	13 17 12 [14 ± 3]	16 20 20 [19 ± 2]	4 3 6 [4 ± 2]
	2500 +	109 105 112 [109 ± 4]	10 10 6 [9 ± 2]	16 15 12 [14 ± 2]	14 19 16 [16 ± 3]	3 6 7 [5 ± 2]
	5000 +	120 122 129 [124 ± 5]	12 7 7 [9 ± 3]	17 15 20 [17 ± 3]	15 14 18 [16 ± 2]	3 3 4 [3 ± 1]
Positive control		584 583 607 [a] [591 ± 14]	438 421 433 [b] [431 ± 9]	137 138 148 [a] [141 ± 6]	528 555 544 [c] [542 ± 14]	577 544 558 [d] [560 ± 17]

+ : Visible precipitation was occurred at the end of exposure period
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5 μg/plate
c): AF-2, 0.1 μg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μg/plate

Table 2. Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (1st trial) [activation method : +S9]

Exp. No. 4183 (115-101)

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Test substance	0	110 120 109 [113 ± 6]	11 12 12 [12 ± 1]	23 25 24 [24 ± 1]	31 34 30 [32 ± 2]	17 13 18 [16 ± 3]
	2.44	115 118 121 [118 ± 3]				
	4.88	131 127 123 [127 ± 4]				
	9.77	160 163 160 [161 ± 2]				
	19.5	187 188 184 [186 ± 2]				
	39.1	218 221 213 [217 ± 4]		20 21 23 [21 ± 2]		
	78.1	184 173 193 [183 ± 10]		23 27 28 [26 ± 3]		
	156 +	160 148 161 [156 ± 7]	18 13 16 [16 ± 3]	20 16 18 [18 ± 2]	28 24 27 [26 ± 2]	17 12 13 [14 ± 3]
	313 +		12 8 10 [10 ± 2]	25 26 23 [25 ± 2]	33 29 35 [32 ± 3]	9 11 10 [10 ± 1]
	625 +		9 11 10 [10 ± 1]	14 20 20 [18 ± 3]	30 25 26 [27 ± 3]	11 11 11 [11 ± 0]
	1250 +		9 10 9 [9 ± 1]	20 16 20 [19 ± 2]	24 24 26 [25 ± 1]	15 12 9 [12 ± 3]
	2500 +		10 12 8 [10 ± 2]	16 15 17 [16 ± 1]	29 32 32 [31 ± 2]	9 9 12 [10 ± 2]
	5000 +		7 9 8 [8 ± 1]	24 21 20 [22 ± 2]	29 33 34 [32 ± 3]	10 7 11 [9 ± 2]
Positive control		951 979 963 a) [964 ± 14]	306 310 321 b) [312 ± 8]	875 863 861 a) [866 ± 8]	461 487 469 c) [472 ± 13]	176 164 165 d) [168 ± 7]

+: Visible precipitation was occurred at the end of exposure period
a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate

Table 3. Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (2nd trial) [direct method : -S9]

Exp. No. 4183 (115-101)

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Test substance	0	100 97 94 [97 ± 3]	11 8 8 [9 ± 2]	15 18 18 [17 ± 2]	17 16 18 [17 ± 1]	4 8 7 [6 ± 2]
	156 +	98 97 95 [97 ± 2]	10 8 8 [9 ± 1]	14 13 15 [14 ± 1]	16 16 16 [16 ± 0]	7 5 4 [5 ± 2]
	313 +	95 97 106 [99 ± 6]	10 7 5 [7 ± 3]	10 17 14 [14 ± 4]	15 12 11 [13 ± 2]	6 7 3 [5 ± 2]
	625 +	90 86 89 [88 ± 2]	5 4 5 [5 ± 1]	13 15 19 [16 ± 3]	11 13 17 [14 ± 3]	8 9 6 [8 ± 2]
	1250 +	86 96 95 [92 ± 6]	7 5 5 [6 ± 1]	14 17 15 [15 ± 2]	10 11 15 [12 ± 3]	4 6 7 [6 ± 2]
	2500 +	92 87 85 [88 ± 4]	7 5 4 [5 ± 2]	13 15 14 [14 ± 1]	12 12 16 [13 ± 2]	8 6 11 [8 ± 3]
	5000 +	89 95 85 [90 ± 5]	5 8 8 [7 ± 2]	15 10 14 [13 ± 3]	15 14 19 [16 ± 3]	5 6 7 [6 ± 1]
Positive control		421 424 406 a) [417 ± 10]	392 410 406 b) [403 ± 9]	134 128 133 a) [132 ± 3]	556 562 572 c) [563 ± 8]	436 419 439 d) [431 ± 11]

+: Visible precipitation was occurred at the end of exposure period
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5 μg/plate
c): AF-2, 0.1 μg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μg/plate

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (2nd trial) [activation method : +S9]

Exp. No. 4183 (115-101)

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Test substance	0	97 101 98 [99 ± 2]	13 10 11 [11 ± 2]	25 20 23 [23 ± 3]	23 25 25 [24 ± 1]	19 15 15 [16 ± 2]
	2.44	110 122 116 [116 ± 6]				
	4.88	137 132 136 [135 ± 3]				
	9.77	132 134 138 [135 ± 3]				
	19.5	150 150 152 [151 ± 1]				
	39.1	159 151 164 [158 ± 7]		25 23 21 [23 ± 2]		
	78.1	144 152 152 [149 ± 5]		23 22 23 [23 ± 1]		
	156 +	151 143 153 [149 ± 5]	5 9 7 [7 ± 2]	27 24 24 [25 ± 2]	24 23 22 [23 ± 1]	9 11 12 [11 ± 2]
	313 +		12 15 8 [12 ± 4]	18 17 21 [19 ± 2]	25 30 30 [28 ± 3]	10 13 9 [11 ± 2]
	625 +		8 5 10 [8 ± 3]	18 20 17 [18 ± 2]	28 23 26 [26 ± 3]	10 8 12 [10 ± 2]
	1250 +		12 7 10 [10 ± 3]	14 17 19 [17 ± 3]	19 18 20 [19 ± 1]	10 7 10 [9 ± 2]
	2500 +		14 10 8 [11 ± 3]	20 23 21 [21 ± 2]	18 18 17 [18 ± 1]	5 10 7 [7 ± 3]
	5000 +		9 12 11 [11 ± 2]	17 19 23 [20 ± 3]	20 16 18 [18 ± 2]	6 7 6 [6 ± 1]
Positive control		931 933 891 a) [918 ± 24]	350 327 329 b) [335 ± 13]	881 876 856 a) [871 ± 13]	483 465 474 c) [474 ± 9]	190 177 181 d) [183 ± 7]

+ : Visible precipitation was occurred at the end of exposure period
a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate

Table 5. Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (confirmative examination : 1st) [activation method : +S9]

Exp. No. 4183 (115-101)

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.] TA100	Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.] TA100
Test substance	0	104 108 113 [108 ± 5]			
	2.44	103 104 99 [102 ± 3]		156 +	150 151 165 [155 ± 8]
	4.88	119 122 129 [123 ± 5]		313 +	130 139 124 [131 ± 8]
	9.77	140 139 139 [139 ± 1]		625 +	132 114 126 [124 ± 9]
	19.5	153 149 156 [153 ± 4]		1250 +	112 128 128 [123 ± 9]
	39.1	191 178 181 [183 ± 7]		2500 +	152 130 137 [140 ± 11]
	78.1	159 171 151 [160 ± 10]		5000 +	132 138 151 [140 ± 10]
			Postive control		905 883 898 a) [895 ± 11]
(Without S9mix)			DMSO	0	92 94 94 [93 ± 1]
			Positive control		437 451 450 b) [446 ± 8]

+ : Visible precipitation was occurred at the end of exposure period
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01μg/plate b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate

Table 6. Results of the bacterial reversion test of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (confirmative examination : 2nd) [activation method : +S9]

Exp. No. 4183 (115-101)

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.] TA100
Test substance	0	113 105 114 [111 ± 5]
	156 +	150 138 161 [150 ± 12]
	313 +	147 152 143 [147 ± 5]
	625 +	130 119 137 [129 ± 9]
	1250 +	127 134 140 [134 ± 7]
	2500 +	111 108 119 [113 ± 6]
	5000 +	113 116 133 [121 ± 11]
Posutive control		882 908 884 a) [891 ± 14]
(Without S9mix) DMSO	0	98 105 93 [99 ± 6]
Positive control		431 454 458 b) [448 ± 15]

+ : Visible precipitation was occurred at the end of exposure period
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01μg/plate b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate