s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：3646 (115－079)

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目　　次

1.	要　　約	7 頁
2.	試　験　題　目	8
3.	試　験　目　的	8
4.	試　験　番　号	8
9.	被　験　物　質	10
10.	試験材料および方法	12
11.	試　験　結　果	18
12.	考察および結論	19
13.	参考とした資料	20

Figures および Tables

Figure 1	Bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- in strain TA100	22
Figure 2	Bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- in strain TA1535	23
Figure 3	Bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- in strain WP2 *uvrA*	24
Figure 4	Bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- in strain TA98	25
Figure 5	Bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- in strain TA1537	26
Table 1	Results of the bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- (1st trial) [direct method : -S9]	27
Table 2	Results of the bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- (1st trial) [activation method : +S9]	28
Table 3	Results of the bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- (2nd trial) [direct method : -S9]	29
Table 4	Results of the bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- (2nd trial) [activation method : +S9]	30

1. 要　　約：

本試験条件下において，s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- 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．

s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- 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，s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- 処理では 156～5000μg／プレートのいずれの試験用量においても，ラット肝ミクロソーム（Ｓ９）添加の有無にかかわらず，溶媒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. 試　験　題　目：

s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- の細菌を用いる復帰突然変異試験

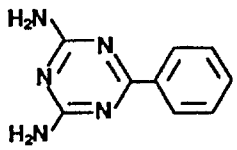
3. 試　験　目　的：

被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討するため，「新規化学物質に係る試験の方法について」（環保業第237号，薬発第306号，62基局第303号昭和62年３月31日）ならびにＯＥＣＤ化学品ガイドライン 471 および 472（1983年５月26日）に従って，細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した．
なお，試験の実施は「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第４条に規定する試験施設について」（環企研第233号，衛生第38号，63基局第823号昭和63年11月18日）ならびにＯＥＣＤのＧＬＰ（1982年）の基準を満たすものとした．

4. 試　験　番　号：

３６４６（115－079）

9. 被 験 物 質：

9.1	被験物質名	s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl-
9.2	ロット番号	
9.3	純　　度	98.0 wt%以上
9.4	不純物の名称および純度	メラミン　　：0.1～0.2% ジシアンジアミド：0.04% ベンゾアミド　：0.01%
9.5	提 供 元	
9.6	別　　名	ベンゾグアナミン
9.7	化 学 名	s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl-
9.8	ＣＡＳ番号	９１－７６－９
9.9	化学構造	
9.10	分 子 量	187.20
9.11	物質の状態	白色粉末
9.12	融　　点	227～228℃

9.13 溶　解　性	メチルソロソルブ	： 約10%
	水（40℃）	： 0.1 g/100 g
	〃（100℃）	： 0.6 g/100 g
	ＤＭＳＯ	： 微溶
	アセトン	： 微溶
	メタノール	： 易溶
	エタノール	： 易溶

9.14 安　定　性　　水，熱，光に対して安定

9.15 残余被験物質の処理　　被験物質の残余は，染色体異常試験終了後に被験物質提供元に返却する．

10. 試験材料および方法：

10.1 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種類の菌株を選択した．

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　　から，また，大腸菌については昭和58年３月16日に　　から分与を受けた．

平成10年１月21日に菌株の特性検査を実施し，本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した．

菌株の保存に当たっては，各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；MERCK 社；純度 99.7%以上，Lot No. K23082678 651）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；三洋電機特機株式会社）に保存（－80℃）した．

10.2 培地の調製

10.2.1 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９年11月21日製造，Lot No. AN680KM）を試験に使用した．本プレートは，Vogel-Bonner 最少培地Ｅを含む下記の組成の溶液 30 mlを無菌的にシャーレに分注したものである．

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；UNIPATH 社；Lot No. 58719）	15 g
精製水	700 ml

10.2.2 トップアガー（軟寒天）

寒天（Bacto-agar：DIFCO 社；Lot No. 111787JF）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 mM L-ヒスチジン（関東化学株式会社；Lot No. 412E1389）-0.5 mM D-ビオチン（関東化学株式会社；Lot No. 801S1718）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 mM 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．

10.3 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（Oxoid Nutrient Broth No.2：UNIPATH 社；Lot No. 028 59365）培養液を 25 ml分注し，これに凍結保存した菌懸濁液を融解した後，マイクロピペットを用いて 50μl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（往復振盪：100回／分）培養した．培養終了後の菌懸濁液を使用時まで室温で保存した．

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	生　菌　数　（$\times 10^9$／ml）				
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
本試験(1回目)	4.64	4.19	4.38	3.94	2.34
本試験(2回目)	4.35	4.40	4.99	3.61	2.67

10.4 S 9 m i x

S9 mix（キッコーマン株式会社；Lot No. FSM-372）を試験に使用した．なお，製造後６ヵ月以内の S9 mix を使用した．S9 調製の際の動物種，性，臓器，誘導物質，誘導方法等ならびに S9 mix の組成を以下に示した．

a. ロット番号	ＲＡＡ－３７２
b. 調 製 日	平成９年10月31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	186 ～ 225 g
f. 臓 器	肝臓
g. 誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
h. 投与量 および 投与回数	PB: 30 mg/kg １回（１日目）， 60 mg/kg ３回（２～４日目） BF: 80 mg/kg １回（３日目）
i. 投与方法	腹腔内投与
j. 蛋白含量	25.3 mg/ml

成 分	S9 mix 1 ml中の量
S 9	0.1 ml
$MgCl_2$	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

10.5 被験物質液

10.5.1 被験物質液の調製

被験物質を DMSO (Lot No. K23082678 651) に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．

10.6 対照群

10.6.1 溶媒対照

溶媒対照として，使用溶媒の DMSO のみで試験した．

10.6.2 陽性対照

DMSO (MERCK 社；Lot No. K23082678 651) を用いて陽性対照物質を溶解し，少量ずつ分注した後，凍結保存（－20℃）した．これを融解した後，試験に用いた．

各菌株について，下記に示した用量で試験した．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．

直接法	菌株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	AF-2	0.01 μg/プレート
〃	TA98	〃	0.1 〃
〃	TA1535	NaN_3	0.5 〃
〃	TA1537	9-AA	80 〃
大腸菌	WP2 *uvrA*	AF-2	0.01 〃

代謝活性化法	菌株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	2-AA	1 μg/プレート
〃	TA98	〃	0.5 〃
〃	TA1535	〃	2 〃
〃	TA1537	〃	2 〃
大腸菌	WP2 *uvrA*	〃	10 〃

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. CAP0185)

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 社；純度 98.0%，Lot No. AQ 08326HN)

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)

10.6.3 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 100μl あるいは S9 mix 500μl 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．

10.7 復帰突然変異試験

10.7.1 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結果を以下に示す.

試験用量	S9	復帰突然変異コロニー数				
(μg/プレート)	mix	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
0	−	133	10	23	14	8
19.5	−	118	11	18	23	3
78.1	−	125	8	18	16	10
313	−	116	16	13	18	2
1250	−	128	16	9	21	7
0	+	132	10	22	22	11
19.5	+	136	13	17	27	9
78.1	+	131	10	22	30	6
313	+	128	14	18	21	8
1250	+	131	12	23	32	8

いずれの処理群においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されず，復帰突然変異コロニー数についても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．

試験	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	5000	5000	5000	5000	5000

10.7.2 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 100μl，次いで直接法の場合，0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.4）を 500μl，代謝活性化法の場合，S9 mix を 500μl分注した．さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100μl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分間振盪培養（プレインキュベーション）した．培養終了後，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．重層したトップアガーが固化した後，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．

1用量当たり3枚のプレートを用いた．また，再現性を確認するため，本試験を独立して2回実施した．

10.7.3　コロニー数計測

被験物質の試験菌株に対する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．次いで，復帰突然変異により生じたコロニーを計数した．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．

10.8　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倍以上に増加し，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．

11. 試　験　結　果：

11.1　本試験（１回目）

試験結果を Figure 1～5 および Table 1～2 に示した.

s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- 処理群では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.

復帰突然変異により生じたコロニー数については，各被験物質処理群とも溶媒対照群の値と比較して明確な増加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，溶媒対照群の２倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した.

なお，代謝活性化法の 2500μg／プレート以上の用量ではコロニー計数時，プレート表面に粉末状の析出物が観察された.

11.2　本試験（２回目）

試験結果を Figure 1～5 および Table 3～4 に示した.

被験物質処理による生育阻害作用はいずれの試験用量においても観察されず，復帰突然変異コロニー数についても溶媒対照群と比較して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，代謝活性化法の 2500μg／プレート以上の用量ではコロニー計数時，プレート表面に粉末状の析出物が観察された.

s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- 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.

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

12. 考察および結論：

s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- 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 5000μg／プレートまで検討した．その結果，s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- 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，溶媒対照と比較し復帰突然変異コロニー数の増加傾向は認められなかった．
なお，溶媒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．
なお，類縁化合物であるs-Triazine, 2,4-diamino-6-methyl-の変異原性については，*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で陰性と報告されている．

以上の試験結果から，本試験条件下においてs-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- 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．

13. 参考とした資料：

・Ames, B, N., Lee, F.D. and Durston, W.E. : An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 782～786, 1973.

・Ames, B, N. et al , : Carcinogens are mutagens : A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 2,281～2,285, 1973.

・Ames B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res., 31, 347～364, 1975.

・　　環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について，蛋白質・核酸・酵素，20（13），16～27，1975.

・労働省安全衛生部化学物質調査課編：　安衛法における変異原性試験－テストガイドラインとＧＬＰ－，中央労働災害防止協会，1991.

・石館　基　監修：　微生物を用いる変異原性試験データ集，エル・アイ・シー，1991.

・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，財団法人　日本化学物質安全・情報センター（JETOC），177，1996.

Exp. No. 3646 (115-079)

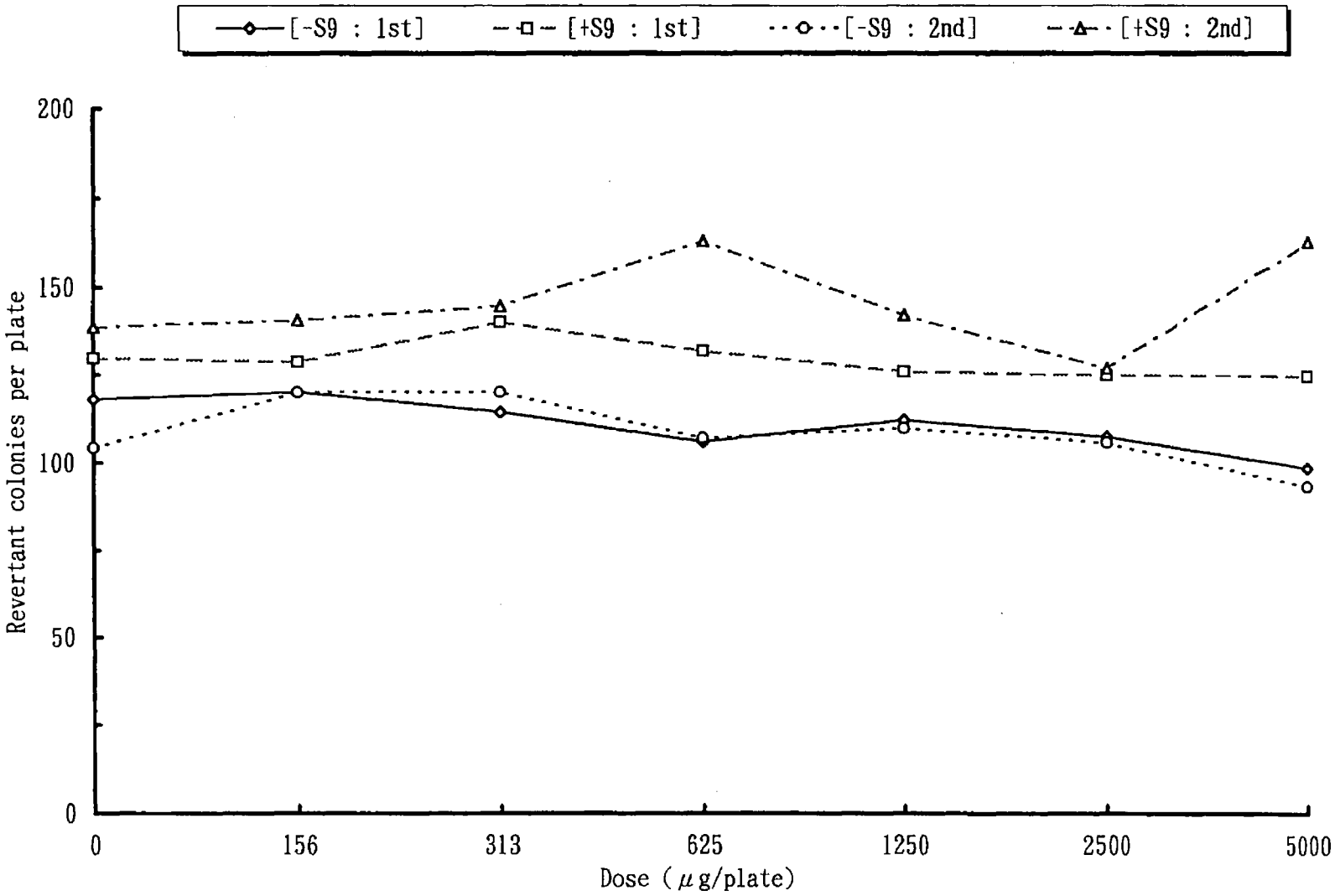


Figure 1. Bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- in strain TA100

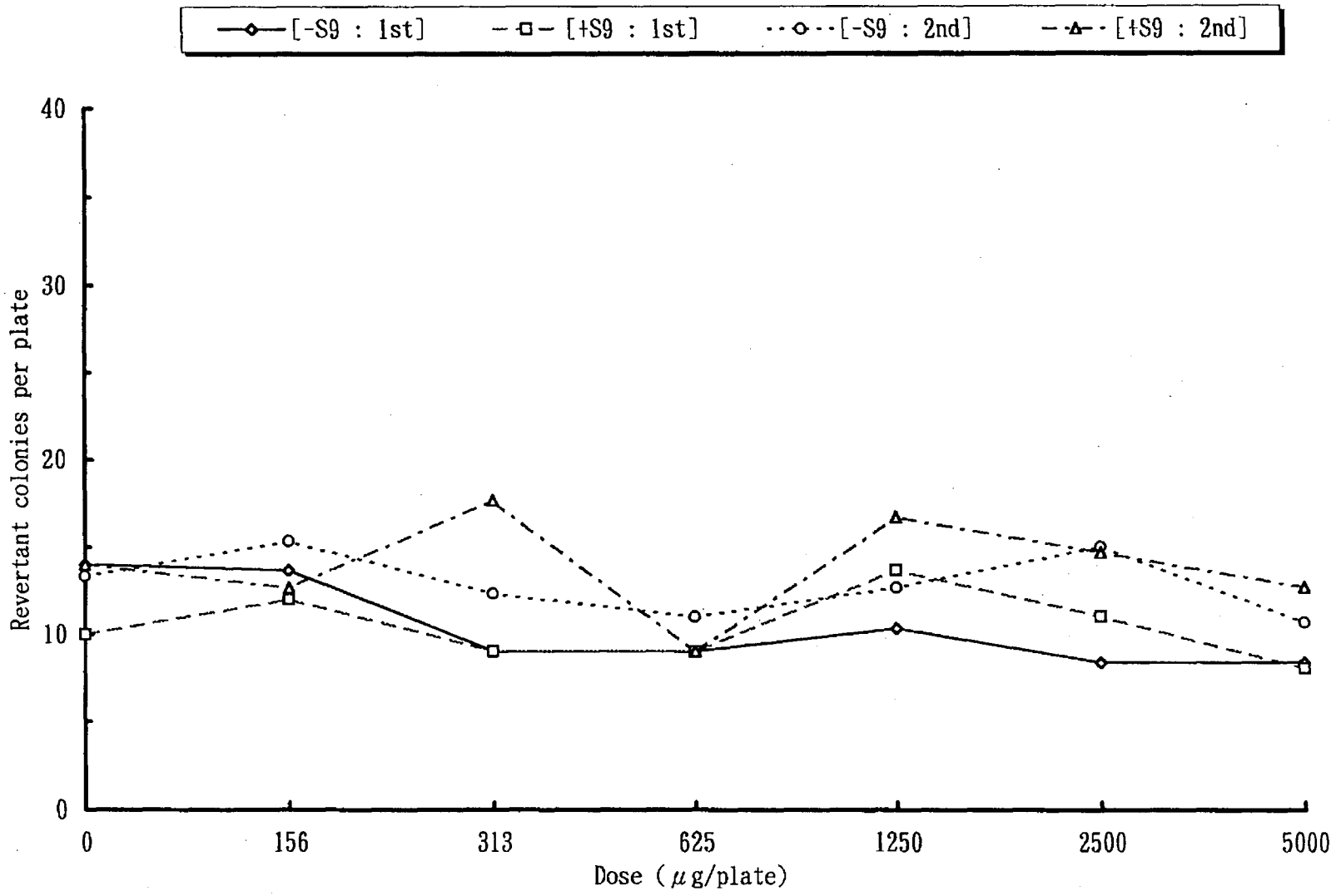


Figure 2. Bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- in strain TA1535

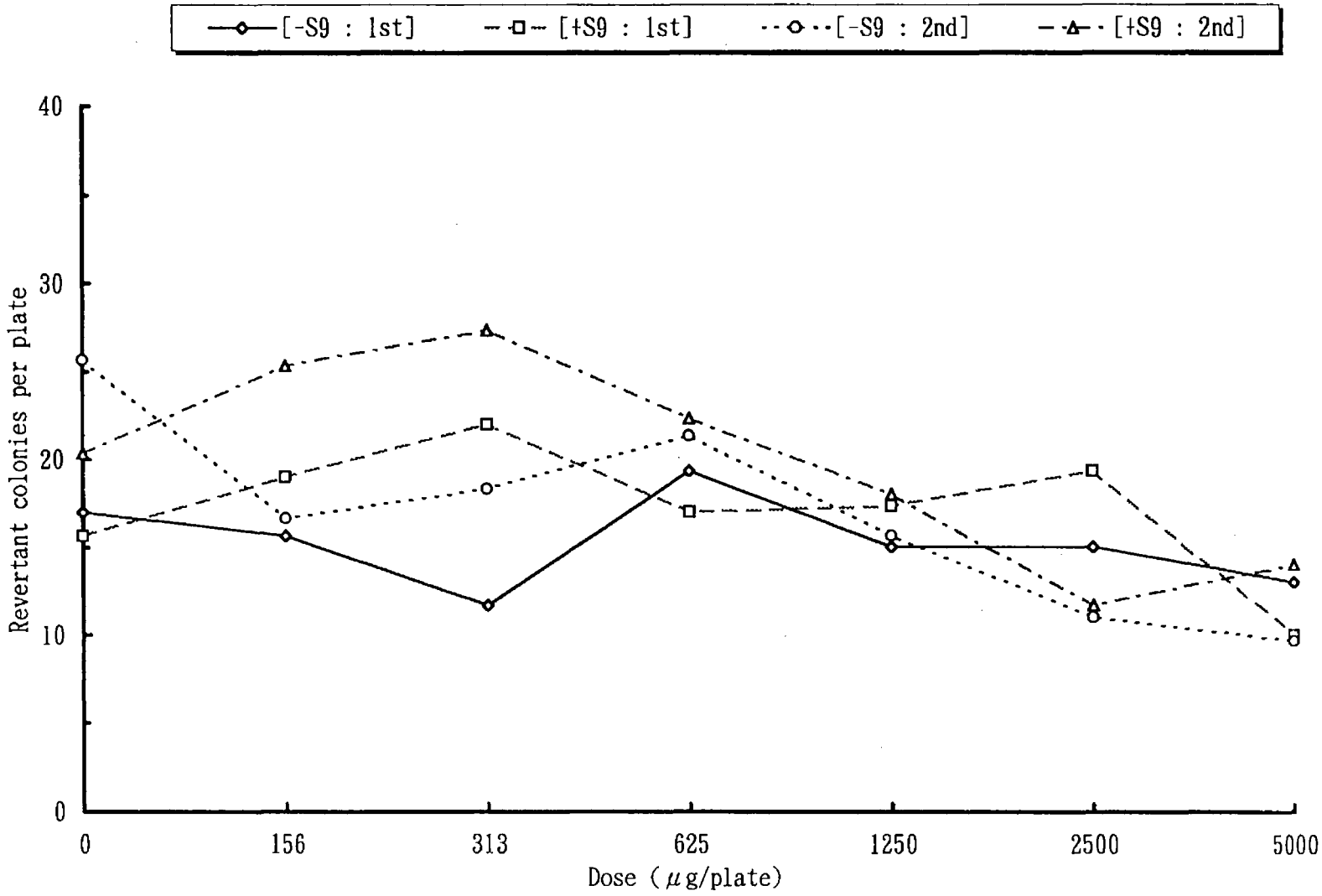


Figure 3. Bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- in strain WP2*uvrA*

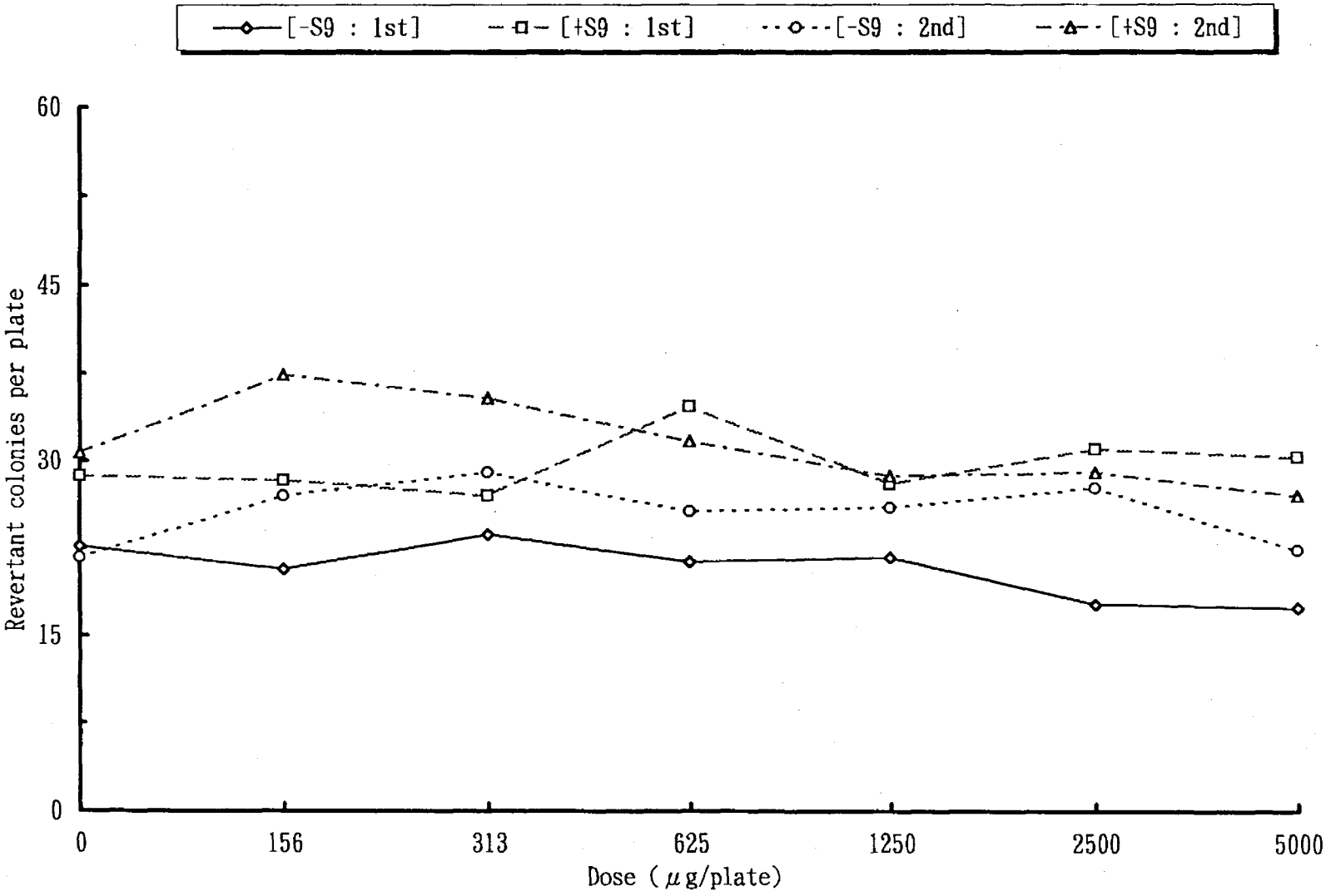


Figure 4. Bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- in strain TA98

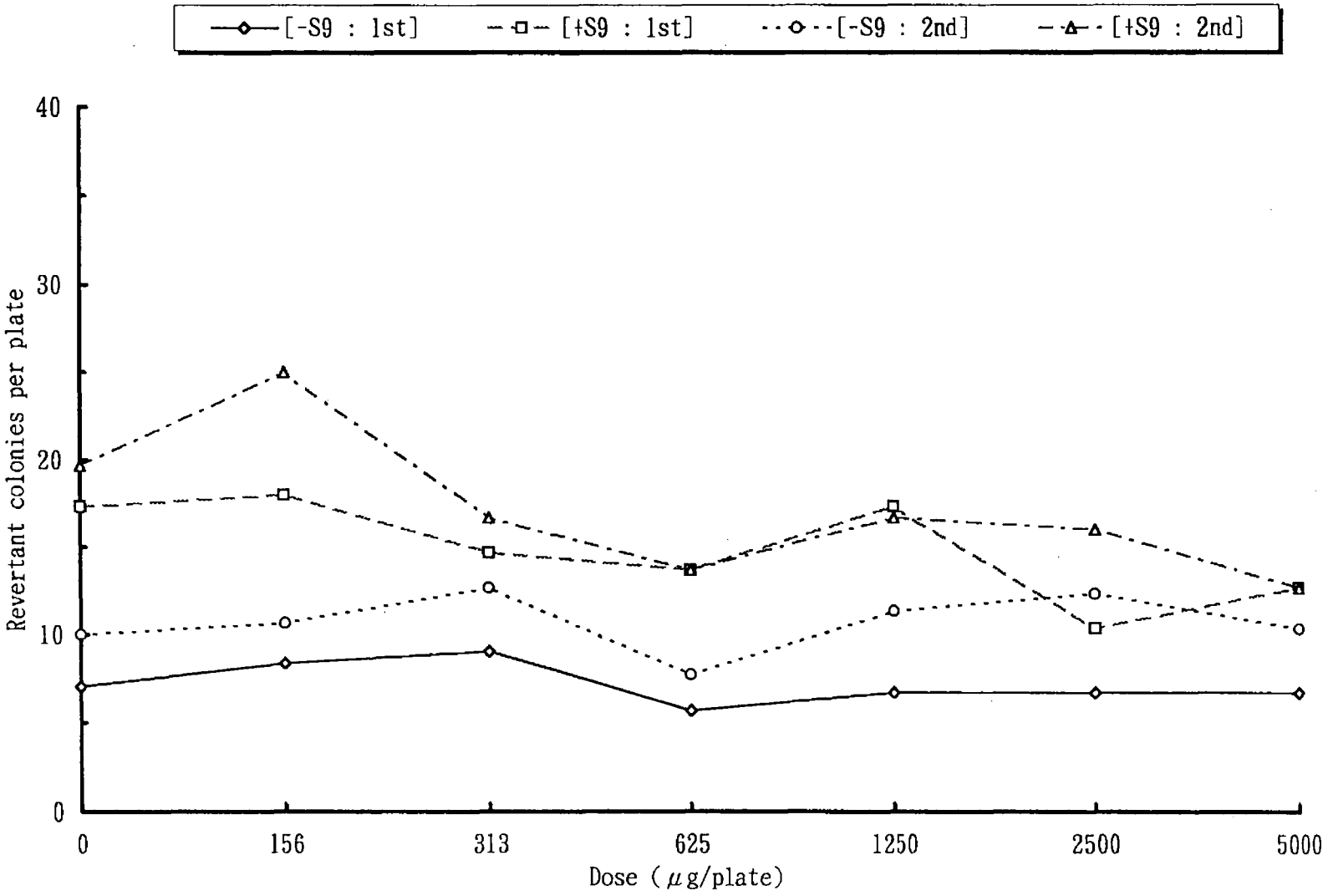


Figure 5. Bacterial reversion test of s-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl- in strain TA1537

Table 1. Results of the bacterial reversion test of s-Triadine, 2,4-diamino-6-phenyl- (1st trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	115 124 115 [118 ± 5]	12 15 15 [14 ± 2]	20 15 16 [17 ± 3]	24 22 22 [23 ± 1]	8 7 6 [7 ± 1]
Test substance	156	119 127 114 [120 ± 7]	15 13 13 [14 ± 1]	16 13 18 [16 ± 3]	21 23 18 [21 ± 3]	10 8 7 [8 ± 2]
	313	116 114 113 [114 ± 2]	9 9 9 [9 ± 0]	12 10 13 [12 ± 2]	25 22 24 [24 ± 2]	7 10 10 [9 ± 2]
	625	101 105 112 [106 ± 6]	8 8 11 [9 ± 2]	17 20 21 [19 ± 2]	18 22 24 [21 ± 3]	6 6 5 [6 ± 1]
	1250	118 109 109 [112 ± 5]	9 9 13 [10 ± 2]	14 16 15 [15 ± 1]	20 23 22 [22 ± 2]	6 7 7 [7 ± 1]
	2500	114 108 100 [107 ± 7]	9 7 9 [8 ± 1]	15 14 16 [15 ± 1]	22 15 16 [18 ± 4]	7 8 5 [7 ± 2]
	5000	93 105 97 [98 ± 6]	7 5 13 [8 ± 4]	9 14 16 [13 ± 4]	16 20 16 [17 ± 2]	5 7 8 [7 ± 2]
Positive control		568 565 572[a)] [568 ± 4]	541 554 549[b)] [548 ± 7]	130 122 120[a)] [124 ± 5]	596 622 625[c)] [614 ± 16]	419 402 424[d)] [415 ± 12]

: Solvent control

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5μg/plate

c): AF-2, 0.1μg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80μg/plate

Table 2. Results of the bacterial reversion test of s-Triadine, 2,4-diamino-6-phenyl- (1st trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
	(μg/plate)	TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	135 124 130 [130 ± 6]	12 8 10 [10 ± 2]	15 14 18 [16 ± 2]	28 31 27 [29 ± 2]	17 17 18 [17 ± 1]
Test substance	156	132 125 129 [129 ± 4]	12 14 10 [12 ± 2]	20 19 18 [19 ± 1]	32 28 25 [28 ± 4]	20 15 19 [18 ± 3]
	313	137 136 147 [140 ± 6]	7 11 9 [9 ± 2]	22 22 22 [22 ± 0]	28 27 26 [27 ± 1]	14 16 14 [15 ± 1]
	625	132 135 128 [132 ± 4]	8 9 10 [9 ± 1]	18 17 16 [17 ± 1]	33 36 35 [35 ± 2]	13 13 15 [14 ± 1]
	1250	127 121 129 [126 ± 4]	14 12 15 [14 ± 2]	16 19 17 [17 ± 2]	26 27 31 [28 ± 3]	17 16 19 [17 ± 2]
	2500 +	130 122 122 [125 ± 5]	9 11 13 [11 ± 2]	16 25 17 [19 ± 5]	35 28 30 [31 ± 4]	12 8 11 [10 ± 2]
	5000 +	124 123 126 [124 ± 2]	5 9 10 [8 ± 3]	11 10 9 [10 ± 1]	32 31 28 [30 ± 2]	12 14 12 [13 ± 1]
Positive control		688 681 706[a)] [692 ± 13]	280 302 299[b)] [294 ± 12]	660 642 673[c)] [658 ± 16]	204 204 213[d)] [207 ± 5]	135 150 147[b)] [144 ± 8]

: Solvent control + : Visible precipitation was occurred

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 s-Triadine, 2,4-diamino-6-phenyl- (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	103 106 104 [104 ± 2]	13 13 14 [13 ± 1]	29 23 25 [26 ± 3]	23 23 19 [22 ± 2]	8 11 11 [10 ± 2]
Test substance	156	119 118 123 [120 ± 3]	17 15 14 [15 ± 2]	17 17 16 [17 ± 1]	30 25 26 [27 ± 3]	8 14 10 [11 ± 3]
	313	125 112 123 [120 ± 7]	10 15 12 [12 ± 3]	15 20 20 [18 ± 3]	30 28 29 [29 ± 1]	13 15 10 [13 ± 3]
	625	113 103 105 [107 ± 5]	10 9 14 [11 ± 3]	21 20 23 [21 ± 2]	29 23 25 [26 ± 3]	7 8 8 [8 ± 1]
	1250	120 103 106 [110 ± 9]	13 11 14 [13 ± 2]	14 18 15 [16 ± 2]	27 24 27 [26 ± 2]	13 11 10 [11 ± 2]
	2500	104 107 106 [106 ± 2]	14 18 13 [15 ± 3]	8 13 12 [11 ± 3]	28 29 26 [28 ± 2]	12 14 11 [12 ± 2]
	5000	101 85 93 [93 ± 8]	9 12 11 [11 ± 2]	8 12 9 [10 ± 2]	21 22 24 [22 ± 2]	11 8 12 [10 ± 2]
Positive control		519 537 499[a)] [518 ± 19]	455 477 479[b)] [470 ± 13]	147 139 149[a)] [145 ± 5]	580 580 562[c)] [574 ± 10]	501 522 495[d)] [506 ± 14]

: Solvent control

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5μg/plate

c): AF-2, 0.1μg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80μg/plate

Table 4. Results of the bacterial reversion test of s-Triadine, 2,4-diamino-6-phenyl- (2nd trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
	(μg/plate)	TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	141 140 135 [139 ± 3]	14 16 12 [14 ± 2]	22 21 18 [20 ± 2]	33 30 29 [31 ± 2]	19 21 19 [20 ± 1]
Test substance	156	140 141 141 [141 ± 1]	13 13 12 [13 ± 1]	28 25 23 [25 ± 3]	40 34 38 [37 ± 3]	28 22 25 [25 ± 3]
	313	142 149 143 [145 ± 4]	20 14 19 [18 ± 3]	28 27 27 [27 ± 1]	36 37 33 [35 ± 2]	18 15 17 [17 ± 2]
	625	169 164 156 [163 ± 7]	12 7 8 [9 ± 3]	22 22 23 [22 ± 1]	31 31 33 [32 ± 1]	16 13 12 [14 ± 2]
	1250	139 144 143 [142 ± 3]	18 17 15 [17 ± 2]	19 18 17 [18 ± 1]	31 27 28 [29 ± 2]	17 16 17 [17 ± 1]
	2500 +	124 124 132 [127 ± 5]	14 17 13 [15 ± 2]	12 11 12 [12 ± 1]	30 26 31 [29 ± 3]	15 16 17 [16 ± 1]
	5000 +	163 165 160 [163 ± 3]	14 11 13 [13 ± 2]	14 14 14 [14 ± 0]	26 26 29 [27 ± 2]	11 14 13 [13 ± 2]
Positive control		832 805 802[a)] [813 ± 17]	343 357 334[b)] [345 ± 12]	763 726 745[c)] [745 ± 19]	266 284 282[d)] [277 ± 10]	143 152 147[b)] [147 ± 5]

: Solvent control + : Visible precipitation was occurred

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate