

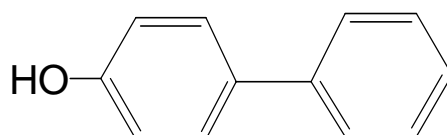
p-Phenylphenol

p - フェニルフェノール

[CAS No. 92-69-3]

Molecular formula: C₁₂H₁₀O

Molecular weight: 170.21



ABSTRACT

The test was conducted using *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537, and *Escherichia coli* (*E. coli*) WP2uvrA/pKM101, by the pre-incubation method with (+S9mix) or without (- S9mix) metabolic activation.

The dose-determination test was performed at eight doses of common ratio 3 up to 5000 µg/plate. The test substance did not increase in number of revertant colonies more than twice that of the negative control (solvent control) in any tester strain with or without metabolic activation. Growth inhibition of the bacterial lawn with the chemical was observed in all tested strains.

The main test was performed with several doses up to the growth inhibition doses. The test substance did not increase in number of revertant colonies more than twice that of the negative control in any strain with or without metabolic activation.

The positive control substances assayed, increased numbers of revertant colonies more than twice that of the solvent control. The numbers of revertant colonies for the negative and positive controls obtained in the present test were within the range of standard values derived from historical control data in our laboratory, which suggested that the tests were performed adequately.

Based on the above results, *p*-phenylphenol was assessed to be non-mutagenic (negative) in the reverse mutation test in bacteria under the test condition.

Genetic Toxicity

Bacterial test

1. Material and method

Purity	: 99.9%
Test species/strain	: <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537, <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> /pKM101
Test method	: Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Chemical Substances Control Law of Japan) and OECD Test Guideline 471
Procedures	: Pre-incubation method
Solvent	: DMSO
Positive controls	: - S9 mix; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (TA100, WP2 <i>uvrA</i> /pKM101, TA98), sodium azide (TA1535) and 9-aminoacridine hydrochloride (TA1537) +S9 mix; 2-Aminoanthracene (all strains)
Dosage	: - S9 mix; 0, 2.29, 6.86, 20.6, 61.7, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate(all strains: Dose-determination test) 0, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313 µg/plate (TA100,TA1535,TA98,TA1537: Main test) 0, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625 µg/plate (WP2 <i>uvrA</i> /pKM101: Main test) +S9 mix; 0, 2.29, 6.86, 20.6, 61.7, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate(all strains: Dose-determination test) 0, 4.88, 9.77, 19.5, 9.1, 78.1, 156, 313 µg/plate (TA100,TA1535,TA98,TA1537: Main test) 0, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625 µg/plate (WP2 <i>uvrA</i> /pKM101: Main test)
S9	: Rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
Plates/test	: 3
Number of replicates	: 2
GLP	: Yes

2. Results

The chemical was assessed to be non-mutagenic (negative) in the reverse mutation test in bacteria under the test condition. Growth inhibition of the bacterial lawn with the chemical (toxicity) was observed all strains tested with or without metabolic activation.

Genetic effects:

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537,

	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]

Escherichia coli WP2 *uvrA*/pKM101

	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]

p-フェニルフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of p-Phenylphenol in Bacteria

要約

試験は、p-フェニルフェノールの細菌に対する復帰突然変異原性の有無を検索することを目的とした。

試験菌株は、ネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株とし、試験方法としてプレインキュベーション法を用い、代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 及び直接法による場合 (-S9 mix) で試験を実施した。

用量設定試験を最高用量 5000 μ g/プレートより公比 3 の 8 用量で実施したが、ネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101 の代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 及び直接法による場合 (-S9 mix) のいずれにおいても、陰性対照 (溶媒対照) 値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認められなかった。生育阻害 (抗菌作用) は、すべての菌株の代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 及び直接法による場合 (-S9 mix) に認められた。

生育阻害を示す用量が最高用量となるように用量を設定して本試験を実施したが、すべての菌株ともに代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 及び直接法による場合 (-S9 mix) のいずれにおいても、陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認められなかった。


陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。

以上の結果より、p-フェニルフェノールは、使用した試験条件において、細菌に対する復帰突然変異原性を有しない (陰性) と判定した。

方法

1. 被験物質

1) 被験物質

被験物質の p-フェニルフェノールは、購入 (ロット番号: WKE2163) したもので、純度 99.9% の白色結晶性粉末である。被験物質は、入手後、使用時まで室温で暗所に保管した。被験物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを測定し、文献値と比較することにより確認した。また、被験物質の安定性は、使用開始前および使用終了後に赤外吸収スペクトルを測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

2) 被験物質溶液の調製

被験物質は、水に 50mg/ml [被験物質溶液量をプレート

当たり 100 μ l にした場合に 5000 μ g の被験物質質量に相当する] 未満であるが、ジメチルスルホキシド (DMSO) に 100mg/ml 以上溶解し、また、被験物質に DMSO を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られないことから DMSO を溶媒に選択した。

媒体として選択した DMSO (分光分析用; 純度 99.7%) は関東化学㈱から購入 (ロット番号: 906X2040) し、使用時まで室温で暗所に保管した。被験物質に DMSO を加え、攪拌して溶解させ直ちに試験に使用した。

2. 陽性対照物質

陽性対照物質は、下記の物質を使用した。

ナトリウム・アジド (NaN₃; 和光純薬工業㈱)

9-アミノアクリジン

(9-AA; Aldrich Chemical Co., Inc.)

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (AF-2; 和光純薬工業㈱)

2-アミノアントラセン (2-AA; 和光純薬工業㈱)

DMSO で調製した陽性対照物質溶液は、500 μ l ずつ凍結用チューブに分注し -80℃ で保存した。試験のために解凍した陽性対照物質溶液の残りは再使用せず廃棄した。

3. 試験菌株

1) 試験菌株

従来から、細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されているほか、平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環企発第 031121002 号、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」の「細菌を用いる復帰突然変異試験」及び OECD 化学品テストガイドライン 471 (微生物突然変異試験 1997 年 7 月 21 日採択) に規定されていることから、ネズミチフス菌¹⁾ TA100, TA1535, TA98, TA1537 及び大腸菌²⁾ WP2uvrA/pKM101 を試験に用いた。

東京大学医科学研究所癌生物学研究部より入手した菌株 (ネズミチフス菌: 1985 年 6 月 21 日入手, 大腸菌: 1983 年 6 月 29 日入手) をあらかじめ遺伝的性質 (特性) を調べて菌の性質が適切であることを確認し、菌懸濁液 0.8 ml に DMSO 0.07ml の割合で混合した菌液を 200 μ l ずつ凍結用チューブに分注し凍結した後、-80℃ で保存した。前培養のために一度解凍した保存菌液は再使用せず廃棄した。

2) 試験菌株の前培養

三角フラスコを用い、15 ml の 2.5%ニュートリエントブロス培養液（ニュートリエントブロス No.2 , Oxoid 社）に解凍した保存菌液 30 μ l を接種し、37 $^{\circ}$ C で 10 時間旋回培養（旋回数：120 回/分）し、静止期の初期で培養を止めた。分光光度計を用い、660nm で 1cm セルの吸光度を測定し、生菌数が 1×10^9 / ml 以上であることを確認し、試験に用いた。

4. S9 及び S9 mix

フェノバルビタール 及び 5,6-ベンゾフラボン を雄の SD ラットに腹腔内投与した肝臓をホモジナイズして、9000G で 10 分間遠心分離した上清³⁾ を S9 として調製したものをキッコーマン(株)より購入し、製造後 6 ヶ月以内のものを試験に使用した。

S9 mix は、1ml あたり下記の組成で試験ごとに調製した。

S9	0.1ml
MgCl ₂	8 μ mol
KCl	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADPH	4 μ mol
NADH	4 μ mol
Na-リン酸緩衝液	100 μ mol

5. 最小グルコース寒天平板培地等

1) トップアガー

寒天 0.6wt%、NaCl 0.5wt%の割合の水溶液を高圧蒸気滅菌し、室温で保存した。それを加温溶解し、ネズミチフス菌に用いるトップアガーの場合 L-ヒスチジンおよび D-ビオチンの最終濃度が 50 μ mol/l、また大腸菌に用いるトップアガーの場合 L-トリプトファンの最終濃度が 50 μ mol/l となるように滅菌したアミノ酸溶液を加え、各トップアガーを調製した。このトップアガーを約 45 $^{\circ}$ C に保温して試験に使用した。

2) 最小グルコース寒天平板培地

オリエンタル酵母工業(株)の最小グルコース寒天平板培地（テスメディア AN 培地）を購入し、製造後 6 ヶ月以内のものを試験に使用した。

6. 試験方法

一般的にブレインキュベーション法の方が感度良く被験物質の変異原性を検出できる^{4,5)}と考えられるため、ブレインキュベーション法を用い、代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)で試験を実施した。

1) 試験方法

被験物質溶液又は溶媒 0.05ml 若しくは陽性対照物質溶液 0.05 ml と S9 mix あるいは 0.1M Na-リン酸緩衝液 0.5 ml と試験菌の前培養液 0.1 ml を試験管に入れ、よく混合し 37 $^{\circ}$ C で 20 分間、恒温振とう水槽中で振とうした。ブレインキュベーションした後、2 ml のトップアガ

ーを加え、直ちに最小グルコース寒天平板培地（プレート）上に広げて固めた。固化したプレートを 37 $^{\circ}$ C で 48 時間、恒温培養器で上下を転倒して培養した。本被験物質の光への安定性は不明であったので、以上の操作は黄色灯下で実施した。

試験菌株の生育阻害(抗菌作用)状況を調べ復帰突然変異コロニー数を測定した。

2) 生育阻害(抗菌作用)の有無の確認方法

40 倍の実体顕微鏡を用い、すべてのプレートについて観察した。被験物質処理したプレートを陰性対照(溶媒対照)のプレートと比較し、アミノ酸要求性の微細なコロニー(バックグラウンドローン)の数が減少するか、減少して大きくなる場合に生育阻害(抗菌作用)があると判定した。

3) 無菌試験

試験に使用したものと同量の調製した S9 mix 溶液及び被験物質溶液(試験に用いた最高用量について実施)を最小グルコース寒天平板培地に軟寒天溶液で重層し、37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養して菌の生育の有無を目視で確認した。

7. 試験結果の解析方法(判定方法)

被験物質の用量の増加とともに復帰突然変異コロニー数が増加し、かつ陰性対照(溶媒対照)の 2 倍以上に増加し、再現性の得られた場合に陽性としてすることとした。⁶⁾

上記の条件が満たされない場合は、陰性としてすることとした。

データ解析のための統計学的手法は用いなかった。

報告書中のコロニー数は実数で表示し、平均値は小数点以下を四捨五入して表示した。

結果および考察

細菌を用いる復帰突然変異試験の結果

用量設定試験をTable-1、本試験の結果をTable-2に示した。

用量設定試験を最高用量5000 μ g/プレートより公比3の8用量で実施したが、ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101の代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)のいずれにおいても、陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰突然変異コロニー数の上昇は認められなかった。生育阻害(抗菌作用)は、すべての菌株の代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)に認められた。

生育阻害を示す用量が最高用量となるように用量を設定して本試験を実施したが、すべての菌株の代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)のいずれにおいても、陰性対照値の2倍以上の復帰突然変異コロニー数の上昇は認められなかった。

陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対

照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準⁷⁾の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。

以上の結果より、p-フェニルフェノールは、今回の試験条件において、細菌に対する復帰突然変異原性を有しない(陰性)と判定した。

文献

参考文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215
- 2) Green, M.H.L. and Muriel, W.J. 1976. Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 38: 3-32.
- 3) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. 1976. A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In "In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing", eds. F.J. de Serres, J.R. Fouts, J.R. Bend and R.M. Philpot, pp.85-88, Elsevier / North-Holland, Amsterdam.
- 4) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. 1980. Factors modulating mutagenicity in microbial tests. In "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens", eds. K.H. Norpoth and R.C. Garner, pp.273-285, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 5) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M. 1977. Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutat. Res.* 48: 121-130
- 6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* / mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364
- 7) 丹後俊郎著, 臨床検査への統計学, pp.74-80, 朝倉書店 (1986)

連絡先

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター
〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445
Tel 0463-82-3911 Fax 0463-82-3860

Correspondence

Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety and Health Association
2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257-0015, Japan
Tel +81-0463-82-3911 Fax +81-0463-82-3860

Table-1

Table of Results (Dose-Determination Test)

Test Substance : *p*-Phenylphenol

With (+) or Without (-) S9Mix	Test substance dose (µg/plate)	Number of revertants (Number of colonies/plate)																	
		Base-pair substitution type												Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA/pKM101			TA98			TA1537					
S9 mix (-)	0	87 (90 ± 6)	86 (90 ± 6)	96 (90 ± 6)	11 (9 ± 2)	9 (9 ± 2)	8 (9 ± 2)	72 (76 ± 7)	71 (76 ± 7)	84 (76 ± 7)	21 (19 ± 3)	16 (19 ± 3)	20 (19 ± 3)	9 (9 ± 1)	8 (9 ± 1)	9 (9 ± 1)			
	2.29	112 (104 ± 18)	83 (104 ± 18)	117 (104 ± 18)	10 (8 ± 3)	9 (8 ± 3)	5 (8 ± 3)	98 (83 ± 13)	76 (83 ± 13)	76 (83 ± 13)	10 (13 ± 4)	18 (13 ± 4)	11 (13 ± 4)	5 (6 ± 3)	3 (6 ± 3)	9 (6 ± 3)			
	6.86	115 (102 ± 12)	99 (102 ± 12)	91 (102 ± 12)	13 (10 ± 3)	7 (10 ± 3)	10 (10 ± 3)	61 (70 ± 9)	78 (70 ± 9)	72 (70 ± 9)	29 (21 ± 7)	15 (21 ± 7)	20 (21 ± 7)	3 (5 ± 2)	6 (5 ± 2)	7 (5 ± 2)			
	20.6	102 (99 ± 8)	90 (99 ± 8)	104 (99 ± 8)	3 (7 ± 4)	8 (7 ± 4)	11 (7 ± 4)	85 (82 ± 6)	75 (82 ± 6)	87 (82 ± 6)	13 (14 ± 2)	16 (14 ± 2)	14 (14 ± 2)	7 (6 ± 1)	7 (6 ± 1)	5 (6 ± 1)			
	61.7	82 (82 ± 5)	86 (82 ± 5)	77 (82 ± 5)	8 (8 ± 1)	9 (8 ± 1)	7 (8 ± 1)	93 (83 ± 9)	75 (83 ± 9)	82 (83 ± 9)	10 (19 ± 9)	28 (19 ± 9)	18 (19 ± 9)	6 (7 ± 2)	6 (7 ± 2)	10 (7 ± 2)			
	185	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	64 (64 ± 1)	64 (64 ± 1)	63 (64 ± 1)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)			
	556	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	31 ⁺ (34 ± 3 ⁺)	36 ⁺ (34 ± 3 ⁺)	34 ⁺ (34 ± 3 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)			
	1667	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)			
	5000 †	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)			
	S9 mix (+)	0	113 (117 ± 6)	124 (117 ± 6)	114 (117 ± 6)	9 (9 ± 1)	9 (9 ± 1)	10 (9 ± 1)	114 (122 ± 8)	124 (122 ± 8)	129 (122 ± 8)	28 (24 ± 5)	18 (24 ± 5)	25 (24 ± 5)	11 (11 ± 3)	13 (11 ± 3)	8 (11 ± 3)		
2.29		117 (119 ± 3)	122 (119 ± 3)	119 (119 ± 3)	11 (7 ± 4)	8 (7 ± 4)	3 (7 ± 4)	155 (142 ± 14)	142 (142 ± 14)	128 (142 ± 14)	20 (25 ± 5)	29 (25 ± 5)	25 (25 ± 5)	10 (10 ± 5)	5 (10 ± 5)	14 (10 ± 5)			
6.86		124 (131 ± 6)	133 (131 ± 6)	136 (131 ± 6)	11 (8 ± 3)	5 (8 ± 3)	7 (8 ± 3)	126 (133 ± 6)	135 (133 ± 6)	137 (133 ± 6)	30 (22 ± 7)	17 (22 ± 7)	18 (22 ± 7)	5 (8 ± 4)	7 (8 ± 4)	13 (8 ± 4)			
20.6		112 (124 ± 19)	146 (124 ± 19)	115 (124 ± 19)	8 (11 ± 3)	14 (11 ± 3)	10 (11 ± 3)	123 (133 ± 9)	139 (133 ± 9)	138 (133 ± 9)	20 (21 ± 5)	26 (21 ± 5)	17 (21 ± 5)	6 (8 ± 3)	11 (8 ± 3)	8 (8 ± 3)			
61.7		122 (130 ± 8)	129 (130 ± 8)	138 (130 ± 8)	14 (12 ± 2)	11 (12 ± 2)	11 (12 ± 2)	135 (119 ± 14)	109 (119 ± 14)	112 (119 ± 14)	17 (25 ± 7)	29 (25 ± 7)	30 (25 ± 7)	10 (11 ± 2)	10 (11 ± 2)	14 (11 ± 2)			
185		0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	92 (95 ± 11)	86 (95 ± 11)	108 (95 ± 11)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0)	0 ⁺ (0 ± 0)	0 ⁺ (0 ± 0)			
556		0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	57 ⁺ (60 ± 10 ⁺)	52 ⁺ (60 ± 10 ⁺)	72 ⁺ (60 ± 10 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)			
1667		0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)			
5000 †		0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)	0 ⁺ (0 ± 0 ⁺)			
Positive control without S9Mix		Name	A F - 2			NaN ₃			A F - 2			A F - 2			9 - A A				
	Dose(µg/plate)	0 . 0 1			0 . 5			0 . 0 0 5			0 . 1			8 0					
	No. of colonies per plate	711 (710 ± 18)	692 (710 ± 18)	727 (710 ± 18)	280 (302 ± 21)	322 (302 ± 21)	304 (302 ± 21)	1457 (1411 ± 72)	1328 (1411 ± 72)	1447 (1411 ± 72)	552 (540 ± 11)	531 (540 ± 11)	537 (540 ± 11)	487 (538 ± 45)	556 (538 ± 45)	571 (538 ± 45)			
Positive control with S9Mix	Name	2 - A A			2 - A A			2 - A A			2 - A A			2 - A A					
	Dose(µg/plate)	1			2			2			0 . 5			2					
	No. of colonies per plate	1244 (1243 ± 34)	1208 (1243 ± 34)	1276 (1243 ± 34)	227 (231 ± 4)	232 (231 ± 4)	235 (231 ± 4)	948 (958 ± 11)	955 (958 ± 11)	970 (958 ± 11)	412 (421 ± 10)	421 (421 ± 10)	402 (421 ± 10)	260 (236 ± 21)	227 (236 ± 21)	222 (236 ± 21)			

Table-2

Table of Results (Main Test)

Test Substance : p-Phenylphenol

With (+) or Without (-) S9Mix	Test substance dose (µg/plate)	Number of revertants (Number of colonies/plate)														
		Base-pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA/pKM101			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	79	85	86	8	11	10	62	81	63	15	21	18	9	8	9
		(83 ± 4)			(10 ± 2)			(69 ± 11)			(18 ± 3)			(9 ± 1)		
	4.88	57	99	79	8	8	8				18	22	18	3	3	7
		(78 ± 21)			(8 ± 0)						(19 ± 2)			(4 ± 2)		
	9.77	90	99	92	7	11	6	67	67	60	17	14	11	7	10	8
		(94 ± 5)			(8 ± 3)			(65 ± 4)			(14 ± 3)			(8 ± 2)		
	19.5	90	89	100	11	13	13	59	72	67	22	16	16	10	6	6
		(93 ± 6)			(12 ± 1)			(66 ± 7)			(18 ± 3)			(7 ± 2)		
	39.1	96	79	79	8	5	6	64	68	77	15	20	21	7	6	9
S9 mix (+)		(85 ± 10)			(6 ± 2)			(70 ± 7)			(19 ± 3)			(7 ± 2)		
	78.1	81	86	64	8	8	3	70	49	55	17	16	11	3	3	7
		(77 ± 12)			(6 ± 3)			(58 ± 11)			(15 ± 3)			(4 ± 2)		
	156	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	57	55	51	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]
		(0 ± 0 [*])			(0 ± 0 [*])			(54 ± 3)			(0 ± 0 [*])			(0 ± 0 [*])		
	313	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	24 [*]	32 [*]	20 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]
		(0 ± 0 [*])			(0 ± 0 [*])			(25 ± 6 [*])			(0 ± 0 [*])			(0 ± 0 [*])		
	625							24 [*]	22 [*]	26 [*]						
								(24 ± 2 [*])								
S9 mix (+)	0	92	89	83	8	10	9	94	99	90	24	22	20	13	13	9
		(88 ± 5)			(9 ± 1)			(94 ± 5)			(22 ± 2)			(12 ± 2)		
	4.88	109	86	100	9	9	11				21	16	30	9	14	14
		(98 ± 12)			(10 ± 1)						(22 ± 7)			(12 ± 3)		
	9.77	86	127	108	13	8	10	98	105	97	28	26	30	6	3	9
		(107 ± 21)			(10 ± 3)			(100 ± 4)			(28 ± 2)			(6 ± 3)		
	19.5	93	101	112	10	11	11	75	93	97	17	33	24	8	10	7
		(102 ± 10)			(11 ± 1)			(88 ± 12)			(25 ± 8)			(8 ± 2)		
	39.1	106	102	89	11	5	7	85	82	94	31	24	25	14	13	11
Positive control without S9Mix		(99 ± 9)			(8 ± 3)			(87 ± 6)			(27 ± 4)			(13 ± 2)		
	78.1	74	90	90	8	11	11	81	85	60	24	31	31	9	10	5
		(85 ± 9)			(10 ± 2)			(75 ± 13)			(29 ± 4)			(8 ± 3)		
	156	76 [*]	76 [*]	89 [*]	9 [*]	8 [*]	8 [*]	72	68	87	18 [*]	16 [*]	21 [*]	9 [*]	10 [*]	10 [*]
		(80 ± 8 [*])			(8 ± 1 [*])			(76 ± 10)			(18 ± 3 [*])			(10 ± 1 [*])		
	313	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	54 [*]	37 [*]	37 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]
		(0 ± 0 [*])			(0 ± 0 [*])			(43 ± 10 [*])			(0 ± 0 [*])			(0 ± 0 [*])		
	625							43 [*]	51 [*]	33 [*]						
								(42 ± 9 [*])								
Positive control with S9Mix	Name	A F - 2			NaN ₃			A F - 2			A F - 2			9 - A A		
	Dose(µg/plate)	0 . 0 1			0 . 5			0 . 0 0 5			0 . 1			8 0		
	No. of colonies per plate	662	677	691	307	330	295	1423	1105	1238	481	512	473	508	561	529
Positive control with S9Mix		(677 ± 15)			(311 ± 18)			(1255 ± 160)			(489 ± 21)			(533 ± 27)		
	Name	2 - A A			2 - A A			2 - A A			2 - A A			2 - A A		
	Dose(µg/plate)	1			2			2			0 . 5			2		
	No. of colonies per plate	1290	1278	1265	246	250	249	918	945	968	408	445	438	192	183	170
		(1278 ± 13)			(248 ± 2)			(944 ± 25)			(430 ± 20)			(182 ± 11)		

[Note]

1. Test substance was dissolved in dimethyl sulfoxide.
2. The asterisks indicated growth inhibition.
3. The number shown in parentheses indicated the average ± standard deviation in each doses.
4. Name of positive control substances abbreviated as ; AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro -2-furyl)acryl-amide,
NaN₃ : Sodium azide, 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene.