

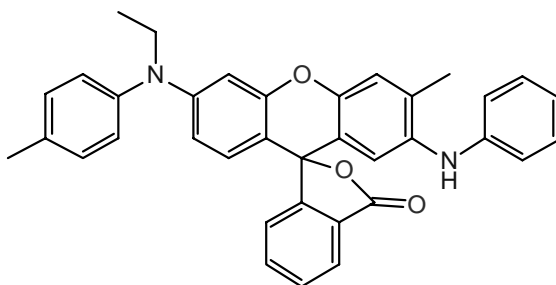
# 2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl) amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H), 9'-[9H]xanthen]-3-one

2' - アニリノ - 6' - [ N - エチル - N - ( 4 - トリ  
ル ) アミノ ] - 3' - メチルスピロ [ イソベンゾフラ  
ン - 1 ( 3 H ) , 9' - [ 9 H ] キサンテン ] - 3 - オン

[CAS No. 59129-79-2]

Molecular formula: C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>

Molecular weight: 539



## 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 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 TA100, TA1535, TA98 and TA1537 without metabolic activation.

The main test was performed with several doses up to the growth inhibition doses or the maximum recommended dose of 5000 µg/plate. 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 main test-2 was performed to confirm dose-response in *S. typhimurium* without metabolic activation, because the dose-determination test could not be detected over 4 doses show no any bacterial growth inhibition, The test substance did not increase in number of revertant colonies more than twice that of the negative control (solvent control) in *S. typhimurium* without metabolic activation.

The positive control substances assayed, increased the 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, 2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl) amino]-3'-methylspiro [isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one 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	: 99.0%
Test species/strain	: <i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537, <i>E. 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, 0.305, 0.610, 1.22, 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1 µg/plate ( <i>S.</i> <i>typhimurium</i> strains: Main test) 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (WP2 <i>uvrA</i> /pKM101: Main test) 0, 0.610, 1.22, 2.44, 4.88, 9.77, 19.5 µg/plate (TA100, Ta1535: Main test-2) 0, 0.305, 0.610, 1.22, 2.44, 4.88, 9.77 µg/plate (TA98, Ta1537: Main test-2) +S9 mix; 0, 2.29, 6.86, 20.6, 61.7, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate(all strains: Dose-determination test) 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (all strains: Main test)
S9	: Rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
Plates/test	: 3
Number of replicates	: 2 or 3
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 in *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA98 and TA1537 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:	[ ]	[ ]	[*]

# 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサントレン]-3-オンの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl) amino]-3'-methylspiro [isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one in Bacteria

### 要約

試験は、2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサントレン]-3-オン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  $\mu$ 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)はネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535, TA1537の直接法による場合(-S9 mix)にみられた。

最高用量5000  $\mu$ g/プレートないし生育阻害(抗菌作用)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、全菌株ともに陰性対照(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。

用量設定試験において生育阻害(抗菌作用)を示さない用量が4用量段階以上得られなかったネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535, TA1537の直接法による場合(-S9 mix)について本試験-2を実施したが、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。

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、2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサントレン]-3-オンは、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 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサントレン]-3-オンは、購入(ロット番号: 0924)したもので、純度 99.0%の微着色粉末である。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

被験物質の溶解度は、水やジメチルスルホキシド(DMSO)に 50mg/ml(被験物質溶液量をプレート当り 100  $\mu$ l にした場合に 5000  $\mu$ g の被験物質質量に相当する)未満であるが、DMSOに 100mg/ml の濃度で懸濁可能である。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。

溶媒として選択した DMSO (分光分析用; 純度 99.7%) は関東化学(株)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 を加え攪拌して懸濁した後、所定濃度に段階希釈し、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 ( $\text{NaN}_3$ ; 和光純薬工業(株))

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(株))

2-アミノアントラセン (2-AA; 和光純薬工業(株))

DMSO で調製した陽性対照物質溶液は、500  $\mu$ 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、環保企発第 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<sup>1)</sup> TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌<sup>2)</sup> 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  $\mu$ 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  $\mu$ l を接種し、37 で 10 時間旋回培養（回転数：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  $1 \times 10^9$  / 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<sup>3)</sup> 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 <sub>2</sub>	8 $\mu$ mol
KCl	33 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
NADH	4 $\mu$ mol
Na-リン酸緩衝液	100 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 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（テストメディア 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

一般的にプ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<sup>4,5)</sup>と考えられるため、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。

### 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 で 20 分間、恒温振とう水槽中で振とうした。プ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 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 で 48 時間培養して菌の生育の有無を目視で確認した。<sup>6)</sup>

## 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する事とした。<sup>6)</sup>

上記の条件が満たされない場合は、陰性とする事とした。

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

用量設定試験の結果を Table-1 に、本試験の結果を Table-2、本試験-2 の結果を Table-3 に示した。

用量設定試験を最高用量 5000  $\mu$ 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)はネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535, TA1537の直接法による場合(-S9 mix)にみられた。

最高用量5000 µg/プレートないし生育阻害(抗菌作用)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、全菌株ともに陰性対照(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。

用量設定試験において生育阻害(抗菌作用)を示さない用量が4用量段階以上得られなかったネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535, TA1537の直接法による場合(-S9 mix)について本試験-2を実施したが、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。

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<sup>7)</sup>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、2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンは、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<sup>+</sup> 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 : 2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl) amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

With (+) or Without (-) S9Mix	Test substance dose (ug/plate)	Number of revertants (Number of colonies/plate)											
		Base-pair substitution type						Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA/pKM101			TA98		
S9 mix ( - )	0	106 ( 115 ± 8 )	120 ( 115 ± 8 )	120 ( 115 ± 8 )	7 ( 7 ± 1 )	8 ( 7 ± 1 )	7 ( 7 ± 1 )	68 ( 70 ± 8 )	79 ( 70 ± 8 )	64 ( 70 ± 8 )	15 ( 15 ± 1 )	14 ( 15 ± 1 )	15 ( 15 ± 1 )
	2.29	113 ( 121 ± 9 )	130 ( 121 ± 9 )	121 ( 121 ± 9 )	11 ( 8 ± 2 )	7 ( 8 ± 2 )	7 ( 8 ± 2 )	92 ( 77 ± 13 )	71 ( 77 ± 13 )	68 ( 77 ± 13 )	14 ( 16 ± 2 )	17 ( 16 ± 2 )	16 ( 16 ± 2 )
	6.86	114 ( 116 ± 12 )	128 ( 116 ± 12 )	105 ( 116 ± 12 )	6 ( 7 ± 2 )	7 ( 7 ± 2 )	9 ( 7 ± 2 )	67 ( 67 ± 9 )	76 ( 67 ± 9 )	59 ( 67 ± 9 )	18 ( 14 ± 4 )	11 ( 14 ± 4 )	14 ( 14 ± 4 )
	20.6	139 <sup>*</sup> ( 127 ± 16 <sup>*</sup> )	109 <sup>*</sup> ( 127 ± 16 <sup>*</sup> )	133 <sup>*</sup> ( 127 ± 16 <sup>*</sup> )	6 <sup>*</sup> ( 7 ± 3 <sup>*</sup> )	10 <sup>*</sup> ( 7 ± 3 <sup>*</sup> )	5 <sup>*</sup> ( 7 ± 3 <sup>*</sup> )	78 ( 81 ± 3 )	83 ( 81 ± 3 )	81 ( 81 ± 3 )	13 <sup>*</sup> ( 13 ± 3 <sup>*</sup> )	16 <sup>*</sup> ( 13 ± 3 <sup>*</sup> )	11 <sup>*</sup> ( 13 ± 3 <sup>*</sup> )
	61.7	119 <sup>*</sup> ( 117 ± 5 <sup>*</sup> )	112 <sup>*</sup> ( 117 ± 5 <sup>*</sup> )	121 <sup>*</sup> ( 117 ± 5 <sup>*</sup> )	11 <sup>*</sup> ( 8 ± 3 <sup>*</sup> )	7 <sup>*</sup> ( 8 ± 3 <sup>*</sup> )	6 <sup>*</sup> ( 8 ± 3 <sup>*</sup> )	68 ( 68 ± 1 )	68 ( 68 ± 1 )	69 ( 68 ± 1 )	18 <sup>*</sup> ( 19 ± 2 <sup>*</sup> )	21 <sup>*</sup> ( 19 ± 2 <sup>*</sup> )	18 <sup>*</sup> ( 19 ± 2 <sup>*</sup> )
	185 <sup>†</sup>	112 <sup>*</sup> ( 114 ± 3 <sup>*</sup> )	112 <sup>*</sup> ( 114 ± 3 <sup>*</sup> )	117 <sup>*</sup> ( 114 ± 3 <sup>*</sup> )	4 <sup>*</sup> ( 5 ± 2 <sup>*</sup> )	4 <sup>*</sup> ( 5 ± 2 <sup>*</sup> )	7 <sup>*</sup> ( 5 ± 2 <sup>*</sup> )	70 ( 78 ± 12 )	73 ( 78 ± 12 )	92 ( 78 ± 12 )	18 <sup>*</sup> ( 17 ± 3 <sup>*</sup> )	14 <sup>*</sup> ( 17 ± 3 <sup>*</sup> )	20 <sup>*</sup> ( 17 ± 3 <sup>*</sup> )
	556 <sup>†</sup>	107 <sup>*</sup> ( 101 ± 7 <sup>*</sup> )	102 <sup>*</sup> ( 101 ± 7 <sup>*</sup> )	94 <sup>*</sup> ( 101 ± 7 <sup>*</sup> )	4 <sup>*</sup> ( 5 ± 2 <sup>*</sup> )	8 <sup>*</sup> ( 5 ± 2 <sup>*</sup> )	4 <sup>*</sup> ( 5 ± 2 <sup>*</sup> )	60 ( 64 ± 10 )	75 ( 64 ± 10 )	56 ( 64 ± 10 )	11 <sup>*</sup> ( 12 ± 3 <sup>*</sup> )	9 <sup>*</sup> ( 12 ± 3 <sup>*</sup> )	15 <sup>*</sup> ( 12 ± 3 <sup>*</sup> )
	1667 <sup>†</sup>	81 <sup>*</sup> ( 83 ± 3 <sup>*</sup> )	82 <sup>*</sup> ( 83 ± 3 <sup>*</sup> )	87 <sup>*</sup> ( 83 ± 3 <sup>*</sup> )	2 <sup>*</sup> ( 7 ± 4 <sup>*</sup> )	9 <sup>*</sup> ( 7 ± 4 <sup>*</sup> )	9 <sup>*</sup> ( 7 ± 4 <sup>*</sup> )	62 ( 57 ± 7 )	61 ( 57 ± 7 )	49 ( 57 ± 7 )	12 <sup>*</sup> ( 13 ± 2 <sup>*</sup> )	15 <sup>*</sup> ( 13 ± 2 <sup>*</sup> )	11 <sup>*</sup> ( 13 ± 2 <sup>*</sup> )
	5000 <sup>†</sup>	73 <sup>*</sup> ( 73 ± 8 <sup>*</sup> )	80 <sup>*</sup> ( 73 ± 8 <sup>*</sup> )	65 <sup>*</sup> ( 73 ± 8 <sup>*</sup> )	4 <sup>*</sup> ( 6 ± 2 <sup>*</sup> )	7 <sup>*</sup> ( 6 ± 2 <sup>*</sup> )	6 <sup>*</sup> ( 6 ± 2 <sup>*</sup> )	36 ( 51 ± 15 )	66 ( 51 ± 15 )	52 ( 51 ± 15 )	18 <sup>*</sup> ( 20 ± 2 <sup>*</sup> )	20 <sup>*</sup> ( 20 ± 2 <sup>*</sup> )	22 <sup>*</sup> ( 20 ± 2 <sup>*</sup> )
S9 mix ( + )	0	126 ( 123 ± 8 )	114 ( 123 ± 8 )	130 ( 123 ± 8 )	7 ( 8 ± 2 )	7 ( 8 ± 2 )	10 ( 8 ± 2 )	108 ( 102 ± 7 )	94 ( 102 ± 7 )	104 ( 102 ± 7 )	31 ( 26 ± 5 )	25 ( 26 ± 5 )	21 ( 26 ± 5 )
	2.29	150 ( 150 ± 21 )	129 ( 150 ± 21 )	170 ( 150 ± 21 )	6 ( 7 ± 1 )	8 ( 7 ± 1 )	7 ( 7 ± 1 )	82 ( 85 ± 6 )	81 ( 85 ± 6 )	91 ( 85 ± 6 )	24 ( 24 ± 1 )	23 ( 24 ± 1 )	25 ( 24 ± 1 )
	6.86	136 ( 140 ± 9 )	151 ( 140 ± 9 )	134 ( 140 ± 9 )	10 ( 8 ± 2 )	7 ( 8 ± 2 )	6 ( 8 ± 2 )	96 ( 99 ± 5 )	97 ( 99 ± 5 )	105 ( 99 ± 5 )	18 ( 23 ± 6 )	22 ( 23 ± 6 )	30 ( 23 ± 6 )
	20.6	166 ( 142 ± 21 )	126 ( 142 ± 21 )	134 ( 142 ± 21 )	9 ( 10 ± 1 )	11 ( 10 ± 1 )	9 ( 10 ± 1 )	99 ( 96 ± 4 )	96 ( 96 ± 4 )	92 ( 96 ± 4 )	29 ( 30 ± 4 )	26 ( 30 ± 4 )	34 ( 30 ± 4 )
	61.7	157 ( 142 ± 13 )	136 ( 142 ± 13 )	134 ( 142 ± 13 )	9 ( 8 ± 1 )	8 ( 8 ± 1 )	7 ( 8 ± 1 )	98 ( 96 ± 3 )	98 ( 96 ± 3 )	92 ( 96 ± 3 )	33 ( 28 ± 4 )	25 ( 28 ± 4 )	26 ( 28 ± 4 )
	185	143 ( 154 ± 26 )	136 ( 154 ± 26 )	184 ( 154 ± 26 )	9 ( 8 ± 3 )	5 ( 8 ± 3 )	11 ( 8 ± 3 )	109 ( 106 ± 9 )	96 ( 106 ± 9 )	112 ( 106 ± 9 )	37 ( 35 ± 5 )	30 ( 35 ± 5 )	39 ( 35 ± 5 )
	556 <sup>†</sup>	129 ( 136 ± 7 )	138 ( 136 ± 7 )	142 ( 136 ± 7 )	9 ( 9 ± 2 )	10 ( 9 ± 2 )	7 ( 9 ± 2 )	87 ( 91 ± 4 )	94 ( 91 ± 4 )	91 ( 91 ± 4 )	17 ( 19 ± 3 )	23 ( 19 ± 3 )	18 ( 19 ± 3 )
	1667 <sup>†</sup>	150 ( 145 ± 6 )	139 ( 145 ± 6 )	147 ( 145 ± 6 )	8 ( 6 ± 3 )	7 ( 6 ± 3 )	3 ( 6 ± 3 )	77 ( 77 ± 2 )	75 ( 77 ± 2 )	79 ( 77 ± 2 )	18 ( 14 ± 4 )	11 ( 14 ± 4 )	13 ( 14 ± 4 )
	5000 <sup>†</sup>	142 ( 134 ± 15 )	143 ( 134 ± 15 )	116 ( 134 ± 15 )	6 ( 5 ± 1 )	5 ( 5 ± 1 )	5 ( 5 ± 1 )	68 ( 65 ± 2 )	64 ( 65 ± 2 )	64 ( 65 ± 2 )	17 ( 19 ± 2 )	19 ( 19 ± 2 )	20 ( 19 ± 2 )
Positive control without S9Mix	Name	A F - 2			NaN <sub>3</sub>			A F - 2			A F - 2		
	Dose(ug/plate)	0 . 0 1			0 . 5			0 . 0 0 5			0 . 1		
	No. of colonies per plate	648 ( 650 ± 9 )	643 ( 650 ± 9 )	660 ( 650 ± 9 )	340 ( 344 ± 16 )	362 ( 344 ± 16 )	330 ( 344 ± 16 )	1449 ( 1404 ± 84 )	1307 ( 1404 ± 84 )	1456 ( 1404 ± 84 )	556 ( 567 ± 12 )	567 ( 567 ± 12 )	579 ( 567 ± 12 )
Positive control with S9Mix	Name	2 - A A			2 - A A			2 - A A			2 - A A		
	Dose(ug/plate)	1			2			2			0 . 5		
	No. of colonies per plate	1354 ( 1324 ± 27 )	1300 ( 1324 ± 27 )	1319 ( 1324 ± 27 )	254 ( 272 ± 17 )	287 ( 272 ± 17 )	275 ( 272 ± 17 )	920 ( 918 ± 64 )	853 ( 918 ± 64 )	980 ( 918 ± 64 )	472 ( 484 ± 13 )	498 ( 484 ± 13 )	482 ( 484 ± 13 )

[ Note ]

1. Test substance was suspended or 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. " † " marks indicate precipitation of the test substance.
5. Name of positive control substances abbreviated as ; AF-2 : 2-( 2-Furyl )-3-( 5-nitro -2-furyl )acryl-amide,  
NaN<sub>3</sub> : Sodium azide, 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene.

Table-2

Table of Results ( Main Test )

Test Substance : 2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl) amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

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	91	92	101	7	10	9	76	60	61	15	10	13	9	11	11
		( 95 ± 6 )			( 9 ± 2 )			( 66 ± 9 )			( 13 ± 3 )			( 10 ± 1 )		
	0.305	76	84	76	6	9	6				10	9	17	3	11	13
		( 79 ± 5 )			( 7 ± 2 )						( 12 ± 4 )			( 9 ± 5 )		
	0.610	85	92	81	7	8	8				14	7	15	9	10	7
		( 86 ± 6 )			( 8 ± 1 )						( 12 ± 4 )			( 9 ± 2 )		
	1.22	82	92	82	6	10	7				9	11	13	11	11	13
		( 85 ± 6 )			( 8 ± 2 )						( 11 ± 2 )			( 12 ± 1 )		
	2.44	91	92	99	13	10	11				13	14	16	7	13	9
		( 94 ± 4 )			( 11 ± 2 )						( 14 ± 2 )			( 10 ± 3 )		
	4.88	108	89	97	11	11	7				11	17	11	5	10	15
		( 98 ± 10 )			( 10 ± 2 )						( 13 ± 3 )			( 10 ± 5 )		
	9.77	75	86	64	7	6	10				11 <sup>*</sup>	16 <sup>*</sup>	18 <sup>*</sup>	6 <sup>*</sup>	13 <sup>*</sup>	11 <sup>*</sup>
		( 75 ± 11 )			( 8 ± 2 )						( 15 ± 4 <sup>*</sup> )			( 10 ± 4 <sup>*</sup> )		
	19.5	71 <sup>*</sup>	91 <sup>*</sup>	78 <sup>*</sup>	10 <sup>*</sup>	3 <sup>*</sup>	8 <sup>*</sup>				14 <sup>*</sup>	10 <sup>*</sup>	15 <sup>*</sup>	13 <sup>*</sup>	10 <sup>*</sup>	7 <sup>*</sup>
		( 80 ± 10 <sup>*</sup> )			( 7 ± 4 <sup>*</sup> )						( 13 ± 3 <sup>*</sup> )			( 10 ± 3 <sup>*</sup> )		
	39.1	74 <sup>*</sup>	83 <sup>*</sup>	76 <sup>*</sup>	9 <sup>*</sup>	6 <sup>*</sup>	7 <sup>*</sup>				18 <sup>*</sup>	13 <sup>*</sup>	10 <sup>*</sup>	8 <sup>*</sup>	7 <sup>*</sup>	7 <sup>*</sup>
		( 78 ± 5 <sup>*</sup> )			( 7 ± 2 <sup>*</sup> )						( 14 ± 4 <sup>*</sup> )			( 7 ± 1 <sup>*</sup> )		
	313 †							51	50	45						
								( 49 ± 3 )								
	625 †							36	46	37						
								( 40 ± 6 )								
	1250 †							41	51	54						
								( 49 ± 7 )								
	2500 †							48	39	63						
								( 50 ± 12 )								
	5000 †							41	39	47						
								( 42 ± 4 )								
S9 mix ( + )	0	111	104	84	11	15	10	71	98	75	26	17	20	13	15	21
		( 100 ± 14 )			( 12 ± 3 )			( 81 ± 15 )			( 21 ± 5 )			( 16 ± 4 )		
	313 †	126	118	94	11	7	9	55	84	78	17	25	18	7	13	8
		( 113 ± 17 )			( 9 ± 2 )			( 72 ± 15 )			( 20 ± 4 )			( 9 ± 3 )		
	625 †	117	112	110	4	8	9	66	75	61	13	17	18	10	10	4
		( 113 ± 4 )			( 7 ± 3 )			( 67 ± 7 )			( 16 ± 3 )			( 8 ± 3 )		
	1250 †	114	113	96	8	13	8	68	76	67	21	18	17	4	8	15
		( 108 ± 10 )			( 10 ± 3 )			( 70 ± 5 )			( 19 ± 2 )			( 9 ± 6 )		
	2500 †	112	115	98	6	15	9	70	60	77	16	12	15	12	10	11
		( 108 ± 9 )			( 10 ± 5 )			( 69 ± 9 )			( 14 ± 2 )			( 11 ± 1 )		
	5000 †	115	102	96	10	14	12	47	65	63	22	19	21	10	8	11
		( 104 ± 10 )			( 12 ± 2 )			( 58 ± 10 )			( 21 ± 2 )			( 10 ± 2 )		
Positive control without S9Mix	Name	A F - 2			NaN <sub>3</sub>			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	657	694	652	326	328	299	1415	1179	1318	374	382	367	379	391	405
		( 668 ± 23 )			( 318 ± 16 )			( 1304 ± 119 )			( 374 ± 8 )			( 392 ± 13 )		
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	1318	1374	1355	248	239	240	1019	865	954	488	475	489	219	245	242
		( 1349 ± 28 )			( 242 ± 5 )			( 946 ± 77 )			( 484 ± 8 )			( 235 ± 14 )		

[ Note ]

- Test substance was suspended or dissolved in dimethyl sulfoxide.
- The asterisks indicated growth inhibition.
- The number shown in parentheses indicated the average ± standard deviation in each doses.
- " † " marks indicate precipitation of the test substance.
- Name of positive control substances abbreviated as ; AF-2 : 2-( 2-Furyl )-3-( 5-nitro -2-furyl )acryl-amide,  
NaN<sub>3</sub> : Sodium azide, 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene.



Table-3

## Table of Results ( Main Test -2)

Test Substance : 2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl) amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

With (+) or Without (-) S9Mix	Test substance dose ( $\mu$ g/plate)	Number of revertants (Number of colonies/plate)											
		Base-pair substitution type						Frameshift type					
		TA100			TA1535			TA98			TA1537		
S9 mix ( - )	0	83	106	87	13	11	11	13	15	18	11	14	7
		( 92 $\pm$ 12 )			( 12 $\pm$ 1 )			( 15 $\pm$ 3 )			( 11 $\pm$ 4 )		
	0.305							9	17	17	6	15	10
								( 14 $\pm$ 5 )			( 10 $\pm$ 5 )		
	0.610	77	83	94	7	9	7	14	15	15	10	14	15
		( 85 $\pm$ 9 )			( 8 $\pm$ 1 )			( 15 $\pm$ 1 )			( 13 $\pm$ 3 )		
	1.22	83	84	68	6	13	14	18	14	16	14	9	11
		( 78 $\pm$ 9 )			( 11 $\pm$ 4 )			( 16 $\pm$ 2 )			( 11 $\pm$ 3 )		
Positive control without S9Mix	2.44	89	99	77	8	9	9	16	10	11	11	13	13
		( 88 $\pm$ 11 )			( 9 $\pm$ 1 )			( 12 $\pm$ 3 )			( 12 $\pm$ 1 )		
	4.88	109	93	91	8	6	13	14	16	14	11	9	15
		( 98 $\pm$ 10 )			( 9 $\pm$ 4 )			( 15 $\pm$ 1 )			( 12 $\pm$ 3 )		
	9.77	90	101	82	10	6	11	15 *	15 *	16 *	8 *	11 *	9 *
		( 91 $\pm$ 10 )			( 9 $\pm$ 3 )			( 15 $\pm$ 1* )			( 9 $\pm$ 2* )		
	19.5	77 *	98 *	77 *	6 *	11 *	11 *						
		( 84 $\pm$ 12* )			( 9 $\pm$ 3* )								
Positive control without S9Mix	Name	A F - 2			NaN <sub>3</sub>			A F - 2			9 - A A		
	Dose( $\mu$ g/plate)	0 . 0 1			0 . 5			0 . 1			8 0		
	No. of colonies per plate	674	671	696	305	316	338	514	522	516	350	416	440
		( 680 $\pm$ 14 )			( 320 $\pm$ 17 )			( 517 $\pm$ 4 )			( 402 $\pm$ 47 )		

[ Note ]

1. Test substance was suspended or dissolved in dimethyl sulfoxide.
2. The asterisks indicated growth inhibition.
3. The number shown in parentheses indicated the average  $\pm$  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,  
NaN<sub>3</sub> : Sodium azide, 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene.