

最終報告書

『ラクトクリエイト（パワーの泉）の細菌を用いる復帰突然変異試験』

試験番号 H-05304

2006年1月26日

東京都中央区八丁堀 2-27-10

株式会社 SRD 生物センター

この写しは、
原本と相違ないことを証明します。
2006年1月26日
試験責任者 佐藤 卓




最終報告書の作成

試験名称：ラクトクリエイト（パワーの泉）の細菌を用いる復帰突然変異試験
試験番号 H-05304

上記試験は非 GLP 試験とし、「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」（平成 11 年 11 月 1 日医薬審 第 1604 号厚生省医薬安全局審査管理課長）および「化粧品の安全性評価に関する指針」（平成 13 年 3 月 30 日、日本化粧品工業連合会編）を参考に実施した。

この試験はここに述べられた方法により行われ、この最終報告書は試験実施により得られた生データを正確に反映したものである。

株式会社 SRD 生物センター

試験責任者 佐藤 卓  (作成)

2006 年 1 月 26 日

試験実施の概括

試験名称：ラクトクリエイト（パワーの泉）の細菌を用いる復帰突然変異試験
試験番号 H-05304

1. 試験目的

ラクトクリエイト（パワーの泉）の変異原性の有無をネズミチフス菌および大腸菌を用いて検討する。

2. GLP

非 GLP 試験として実施した。

3. 参照したガイドライン

「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」（平成 11 年 11 月 1 日 医薬審 第 1604 号厚生省医薬安全局審査管理課長）および「化粧品安全性評価に関する指針」（平成 13 年 3 月 30 日、日本化粧品工業連合会編）

4. 試験委託者

名称	株式会社クリエイト
所在地	佐賀県鳥栖市幸津町 923-3

5. 試験受託者

名称	株式会社 SRD 生物センター
所在地	東京都中央区八丁堀 2-27-10

6. 試験施設

名称	株式会社 SRD 生物センター 渋川ラボラトリー
所在地	群馬県渋川市有馬 1967-11
運営管理者	渡辺 宏生

7.記録および資料の保存

(1) 保存期間

試験終了後 5 年間保存する。

(2) 保存物、保存場所

試験計画書（原本）、試験に関する記録文書、最終報告書（原本）、
試験実施によって得られた生データ、資料類
：株式会社 SRD 生物センター 渋谷ラボラトリー

8.試験期間

試験開始日	2005 年 12 月 20 日
実験開始日	2005 年 12 月 22 日
実験終了日	2006 年 1 月 16 日
最終報告書草案提出日	2006 年 1 月 24 日
最終報告書作成日	2006 年 1 月 26 日
試験終了日	2006 年 1 月 26 日

9.業務分担および試験従事者

試験責任者、試験計画書の作成、業務の指示・管理および最終報告書の作成

: 佐藤 卓^{注)}

被験物質の管理および調製

: 奥谷 冴子

試験操作、培養液と試薬の調製、コロニーカウントおよびデータの処理

: 佐藤 卓、奥谷 冴子

判 定

: 佐藤 卓

注) 所属 : 株式会社 SRD 生物センター 変異原性研究部

予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態
及び試験計画書からの逸脱

試験名称：ラクトクリエイト（パワーの泉）の細菌を用いる復帰突然変異試験
試験番号 H-05304

予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び
試験計画書からの逸脱はなかつた。

目 次

	頁
最終報告書の作成	(5 の 1)
試験実施の概括	(5 の 2)
予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態 及び試験計画書からの逸脱	(5 の 5)
I. 要 約	1
II. 試験目的	2
III. 試験材料および方法	2
IV. 試験結果	9
V. 考察および結論	10
VI. 参考文献	11
Fig.1 Dose depending effect of LACTO CREATE (power no izumi) in the strains of base-pair substitution (Mutagenicity test).	12
Fig.2 Dose depending effect LACTO CREATE (power no izumi) in the strains of frameshift (Mutagenicity test).	13
Appendix 1 Reverse mutation test of LACTO CREATE (power no izumi) in <i>S.typhimurium</i> and <i>E.coli</i> (Dose determination test)	14
Appendix 2 Reverse mutation test of LACTO CREATE (power no izumi) in <i>S.typhimurium</i> and <i>E.coli</i> (Mutagenicity test)	15
Attached sheet 1 Historical background data	16

I. 要 約

ラクトクリエイト（パワーの泉）の変異原性について、ネズミチフス菌のヒスチジン要求性である TA98、TA100、TA1535、TA1537 株および大腸菌のトリプトファン要求性である WP2uvrA 株にそれぞれ処置し、その変異原性を代謝活性化によらない場合と代謝活性化による場合で検討した。

本試験の用量として全試験菌株について 5000、2500、1250、625、312.5 μ g/plate の計 5 用量とした。この結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、代謝活性化系の有無に関わらず、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。また、全試験菌株について用量設定試験との間に再現性も確認された。なお、生育阻害および被験物質の沈殿は認められなかった。

一方、各試験菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数は、いずれも陰性対照群と比較して顕著な増加が認められた。

以上の結果より、当該試験条件下におけるラクトクリエイト（パワーの泉）の変異原性は、陰性と判断された。

II. 試験目的

ラクトクリエイト（パワーの泉）の変異原性の有無をネズミチフス菌および大腸菌を用いて検討する。

III. 試験材料および方法

1. 被験物質^注

- (1) 名 称 : ラクトクリエイト（パワーの泉）
- (2) Lot No. : 51107
- (3) 常温における性状
: 無色透明から茶褐色を有する液体
- (4) 溶解性 : 水に 100%可溶
- (5) pH : 3.41
- (6) 製造年月日 : 2005 年 11 月 7 日
- (7) 保管条件 : 冷蔵
- (8) 提供者
名 称 : 太邦株式会社 研究開発課
所在地 : 兵庫県西宮市西宮浜 1-29-5
- (9) 残余被験物質の処分
: 関連試験終了後、残余被験物質の全てを廃棄する。

^注 : 特性、安定性は試験委託者の情報による

2. 対照物質

(1) 陰性対照物質

注射用蒸留水 (Lot No. 40105D、局方、扶桑薬品工業株式会社) を用いた。

(2) 陽性対照物質

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

(Lot No. PKE1831、純度：99.0%、和光純薬工業株式会社)

SA : Sodium azide

(Lot No. ELJ6565、純度：99.7%、和光純薬工業株式会社)

9-AA : 9-Aminoacridine

(Lot No. 106F06682、純度：97%、SIGMA CHEMICAL Co., Ltd.)

2-AA : 2-Aminoanthracene

(Lot No. TCG4316、純度：97.4%、和光純薬工業株式会社)

上記の各化合物を使用した。

3. 被験物質の調製

(1) 使用した溶媒の名称とその選択理由

注射用蒸留水 (Lot No. 40105D、局方、扶桑薬品工業株式会社) を用いた。本被験物質は試験委託者の情報によると、水に100%可溶とある。事前に注射用蒸留水での20%溶液における安定性を目視により確認した結果、発熱、発泡、着色(変色)が無かったため安定と判断し、注射用蒸留水を選択した。

(2) 被験物質溶液の調製

用量設定試験および本試験ともに、被験物質を高精度・分析用セミ・マイクロ電子天びん(型式：ER-182A、株式会社エー・アンド・デイ)で250 mg秤量後、注射用蒸留水を加え溶解させ、5 mLにメスアップした。これをシリンジフィルター(0.45 μ m、IWAKI GLASS)で濾過滅菌したものを最高用量とし、段階希釈して試験に供した。溶媒中での安定性を調製時に目視により確認した結果、発熱、発泡、着色(変色)がなかったことから安定と判断した。なお、濃度分析は実施しなかった。

4. 対照物質の調製

(1) 陰性対照物質

被験物質の調製時に溶媒として用いた注射用蒸留水を使用した。

(2) 陽性対照物質

AF-2、9-AA、2-AA には DMSO (Lot No. CEF2143、特級、和光純薬工業株式会社)、SA には注射用蒸留水 (Lot No. 40105D、局方、扶桑薬品工業株式会社) をそれぞれ溶媒として溶液を調製し、 -80°C 以下 (超低温フリーザー、型式: MDF-192AT、三洋電機特機株式会社) で凍結保存した、調製後 1 年以内のものを用时に解凍して用いた。

5. 試験菌株

(1) 菌株名、選択の理由および保存方法

以下の特性を持つ菌株を使用した。

	アミノ酸要求性 ^a	膜変異 rfa 特性 ^b	薬剤耐性因子 ^c	紫外線感受性 ^d
ネズミチフス菌				
TA98	his-	rfa	+pKM101	uvrB
TA100	his-	rfa	+pKM101	uvrB
TA1535	his-	rfa	-	uvrB
TA1537	his-	rfa	-	uvrB
大腸菌				
WP2uvrA	trp-	Wild	-	uvrA

ネズミチフス菌: *Salmonella typhimurium*

大腸菌: *Escherichia coli*

^a: ヒスチジン要求性 (his-)、トリプトファン要求性 (trp-) を示す。

^b: rfa は膜変異特性を持ち、クリスタルパイオレット致死感受性を示す。

^c: +pKM101 は薬剤耐性プラスミドを持ち、アンピシリン耐性を示す。

^d: uvrA、uvrB は DNA 修復遺伝子の欠損を示し、紫外線致死感受性を示す。

変異原物質に対する感受性が高く、微生物を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている前記ネズミチフス菌および大腸菌 (2004 年 3 月 26 日、日本バイオアッセイ研究センター、所在地: 神奈川県秦野市平沢 2445 より入手) を使用した。なお、入手後 8 時間培養した各試験菌株 8 mL に、DMSO を 0.7 mL の割合で加え、急速凍結 (分注保存、サンヨー超低温フリーザー、型式: MDF-192AT、三洋メディカシステム株式会社、 -80°C 以下) した。また、各試験菌株の保存ロットについて遺伝的特性の確認を行い、適合したものを使用した。

(2) 前培養

液体栄養培地 (Nutrient broth No.2、Lot No. 289556、OXOID 社) 12 mL に、解凍した各試験菌株保存液 24 μ L を無菌操作にて接種し、ウォーターバスシェイカー (型式: L-10、タイテック株式会社) およびプログラムユニット (型式: PU-9、タイテック株式会社) を用いて 37.0°C、80 回/min の条件下で 10 時間振盪して前培養した。前培養終了後、各菌懸濁液の吸光度をクレット光電光度計 (富士工業株式会社、測定波長 660 nm) を用いて測定し、菌数の確認を行った結果、各菌株は $1.4\sim 2.3\times 10^9$ /mL であった。

6.使用培地

(1) 液体栄養培地

Nutrient broth No.2 を 2.5% となるよう純水に溶解した。L 字型試験管 (容量 30 mL) に 12 mL ずつ分注した後、オート高圧滅菌器 (型式: HA-300M II、株式会社平山製作所) で滅菌した。

(2) 最少グルコース寒天平板培地

バイタルメディア AMT-O 培地 (Lot No. DZL6A701 極東製薬工業株式会社より購入した生培地) を使用した。製造後 6 ヶ月以内のものを用いた。

(3) シャーレの識別

シャーレの側面および蓋に、油性インキで識別番号を記入した。

(4) トップアガー

0.5% NaCl を含む 0.6% 軟寒天 (Bacto Agar、Lot No.4188799、Difco Laboratories) 溶液に、ネズミチフス菌の場合 0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No.052K0903、SIGMA CHEMICAL Co., Ltd.) -0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No.129H0974、SIGMA CHEMICAL Co., Ltd.) 溶液を、大腸菌の場合 0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. TCF4760、和光純薬工業株式会社) 溶液を容量比 10 : 1 で混合した。

7.ラット肝ホモジネート (S9) および S9 mix

(1) S9 の種類と購入先および保存法

Phenobarbital および 5,6-Benzoflavone で誘導された Sprague-Dawley 系雄性ラットの S9 (Lot No. RAA-526) をキッコーマン株式会社から購入し、-80°C 以下 (サンヨー超低温フリーザー、型式: MDF-192AT、三洋メディカシステム株式会社) で保存した製造後 6 ヶ月以内のものを用時に解凍して用いた。

(2) S9 mix の組成と調製法

成 分	組 成
S9	0.1 mL (10%)
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
(1 mL 当たり)	

S9 mix は上記組成で必要量を用時調製した。調製方法として、グルコース-6-リン酸 (Lot No. 115502)、NADH (Lot No. 010506) および NADPH (Lot No. 050502、以上、オリエンタル酵母工業株式会社) を純水に溶解し、これに 0.4 mol/L MgCl₂、1.65 mol/L KCl の混合液、さらに 0.2 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) を混合させ、シリンジフィルター (0.20 μm、IWAKI GLASS) で濾過滅菌した後、解凍した S9 を加えた。なお、使用中は氷冷した。

8. 用 量

用量設定試験では 5、10、50、100、500、1000 および 5000 μg/plate、本試験では 312.5、625、1250、2500 および 5000 μg/plate で行った。

9. 試験方法

用量設定試験および本試験ともにプレインキュベーション法¹⁾で実施した。培養系列として、代謝活性化によらない場合と代謝活性化による場合の 2 系列とした。

10. 試験の操作

(1) 処理方法

試験物質液 (陰性対照物質、被験物質溶液、陽性対照物質液) 0.1 mL および 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4、代謝活性化によらない場合) あるいは S9 mix (代謝活性化による場合) 0.5 mL を乾熱滅菌したガラスチューブ (径: 13 mm × 長さ: 100 mm) に入れ、その後、菌懸濁液 0.1 mL を加え 37.0°C に設定した恒温振盪機 (型式: SHK-100B、岩城硝子株式会社) 中で 20 分間振盪した。20 分間の振盪後、45.0°C に加温したトッパアガー 2 mL を加えて攪拌し、最少グルコース寒天平板培地 (AMT-O 培地) に重層して固めた。用量設定試験では 1 用量当たり 2 枚、本試験では陰性対照群には 3 枚、その他の用量には 2 枚のプレートそれぞれを使用した。

(2) 各試験菌株に対する陽性対照物質の処理量

菌株	代謝活性化によらない場合(-S9)		代謝活性化による場合(+S9)	
	物質名	用量(μ g/plate)	物質名	用量(μ g/plate)
ネisseria meningitidis				
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5
TA100	AF-2	0.01	2-AA	1
TA1535	SA	0.5	2-AA	2
TA1537	9-AA	80	2-AA	2
大腸菌				
WP2uvrA	AF-2	0.01	2-AA	10

(0.1 mL/plate)

(3) 無菌試験

被験物質溶液（最高用量）および S9 mix について無菌試験を行った。

(4) 培養法および培養時間

トップアガールの固化後、最少グルコース寒天平板培地を倒置して 37.0°C に設定したインキュベーター（型式：MIR-253、三洋電機メディカシステム株式会社）に入れ 48 時間培養し、培養時間経過後は冷却した。培養時間の管理はインキュベーターのプログラムで行った。

11. 観察および測定

(1) コロニー数の計測

培養後、各プレートに発生した復帰変異コロニー数を計測した。陰性対照群および被験物質群の場合には肉眼によるマニュアル計測で行い、陽性対照群の場合にはコロニーカウンター（型式：Olympus、OL-502A、吉川工業株式会社）による機器計測を行った。機器計測ではプレート 1 枚につき 3 回（約 120° ずつ回転させる）計測し、平均値を算出した。用量設定試験および本試験で得られた 1 用量当たり 2 ないし 3 プレートの復帰変異コロニー数について、それぞれ平均値を算出し、その値を当該用量のコロニー数とした。

(2) バックグランドローンの観察

計測の際は同時に、双眼実体顕微鏡（型式：CSZ、株式会社内田洋行）を用いて、バックグランドローンから被験物質に対する菌の生育阻害の有無および被験物質の沈殿の状態について確認した。

12.結果の判定

被験物質で処理した各用量の復帰変異コロニー数が陰性対照群の 2 倍以上に増加し、その結果に再現性および被験物質との用量依存性が認められた場合、または単独な用量で陰性対照群の 2 倍以上に増加し、再現性が認められた場合の結果は陽性（+）と判定し、それ以外は陰性（-）と判定した。生育阻害の判定基準は、被験物質群のバックグラウンドローンが陰性対照群のものに比べ、明らかに粗、あるいは透明である場合とした。

13.統計学的解析

統計学的手法は用いなかった。

IV. 試験結果

被験物質の各試験菌株に対する生育阻害の有無および被験物質の沈殿を確認するため、さらに本試験の用量を設定するため、代謝活性化によらない場合と代謝活性化による場合により 5000、1000、500、100、50、10 および 5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の濃度で用量設定試験を行った。その結果、生育阻害および被験物質の沈殿は認められなかった。なお、被験物質群の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった

(Appendix 1)。このことから、本試験では全試験菌株について 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量に設定し、以下公比 2 で 2500、1250、625、312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の計 5 用量とした。

本試験の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、代謝活性化系の有無に関わらず、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害および被験物質の沈殿は認められなかった (Fig.1、2、Appendix 2)。

一方、各試験菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数は、いずれも陰性対照群と比較して顕著な増加が認められた。

V. 考察および結論

ラクトクリエイト（パワーの泉）の変異原性について、ネズミチフス菌（TA98、TA100、TA1535、TA1537 株）および大腸菌（WP2uvrA 株）を用いる変異原性試験（代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合）により検討した。

本試験の用量を設定するため 5～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の濃度で用量設定試験を実施した。その結果、生育阻害および被験物質の沈殿は認められなかった。なお、被験物質群の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。このことから、本試験では全試験菌株について 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量に設定し、以下公比 2 で計 5 用量とした。

本試験の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、代謝活性化系の有無に関わらず、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。また、全試験菌株について用量設定試験との間に再現性も確認された。なお、生育阻害および被験物質の沈殿は認められなかった。

陰性および陽性対照群のそれぞれの復帰変異コロニー数は、共に背景データ（Attached sheet 1）の Mean \pm 2S.D.の近似値であったことから、当該試験が適正な条件下で実施されたことが確認された。

なお、用量設定試験および本試験で実施した無菌試験では、雑菌の汚染は認められなかった。

以上の結果より、当該試験条件下におけるラクトクリエイト（パワーの泉）の変異原性は、陰性と判断された。

VI. 参考文献

- 1) Maron, D.M., Ames, B.N., : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Res., 113, 173-215, 1983.
- 2) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T., and Okada, M., : Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella, Mutation Res., 48, 121-130, 1977.

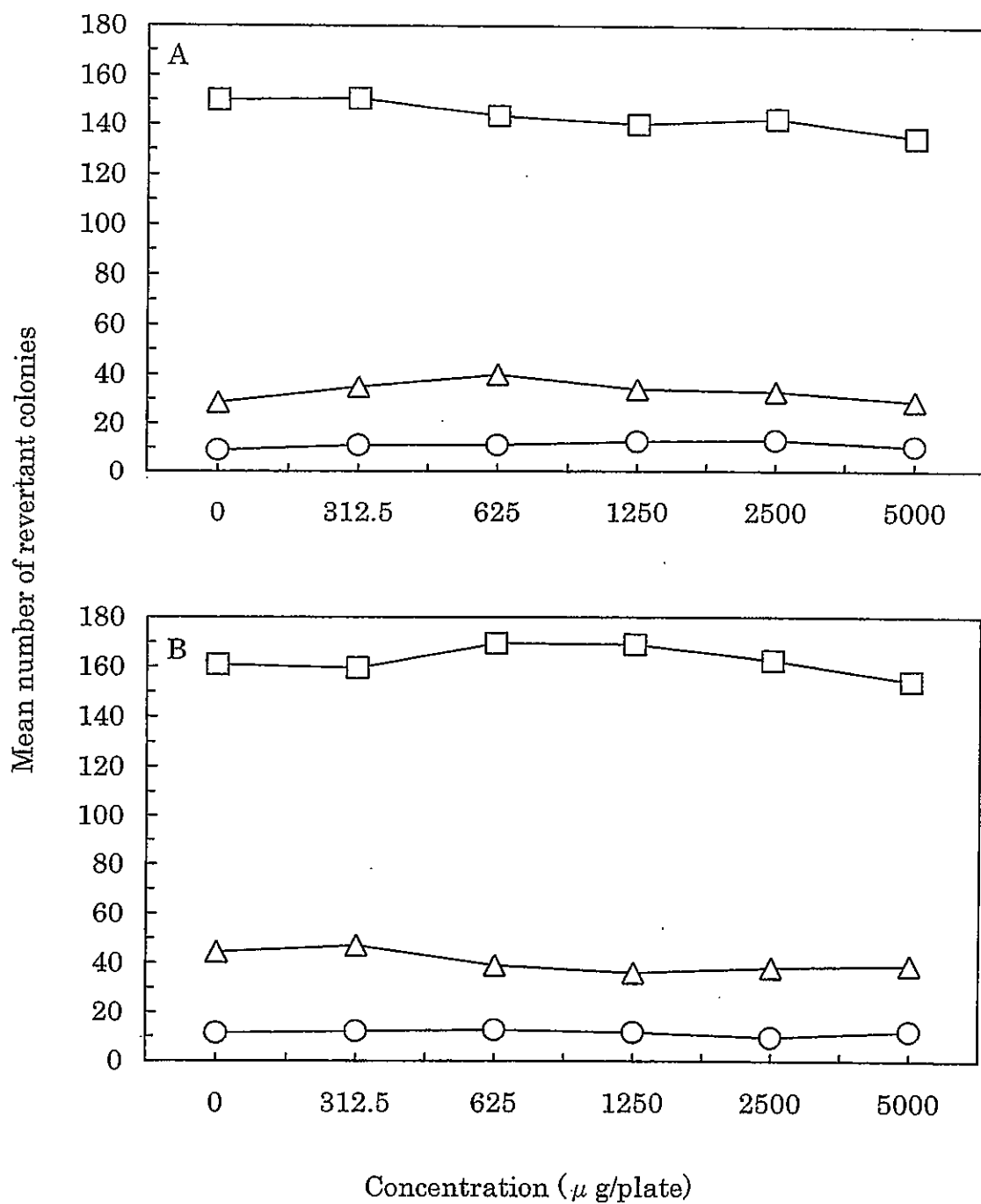


Fig. 1. Dose depending effect of LACTO CREATE (power no izumi) in the strains of base-pair substitution (Mutagenicity test).

A: Without metabolic activation system (-S9mix)

B: With metabolic activation system (+S9mix)

□ : TA100 ; ○ : TA1535 ; △ : WP2uvrA

Study No. H-05304

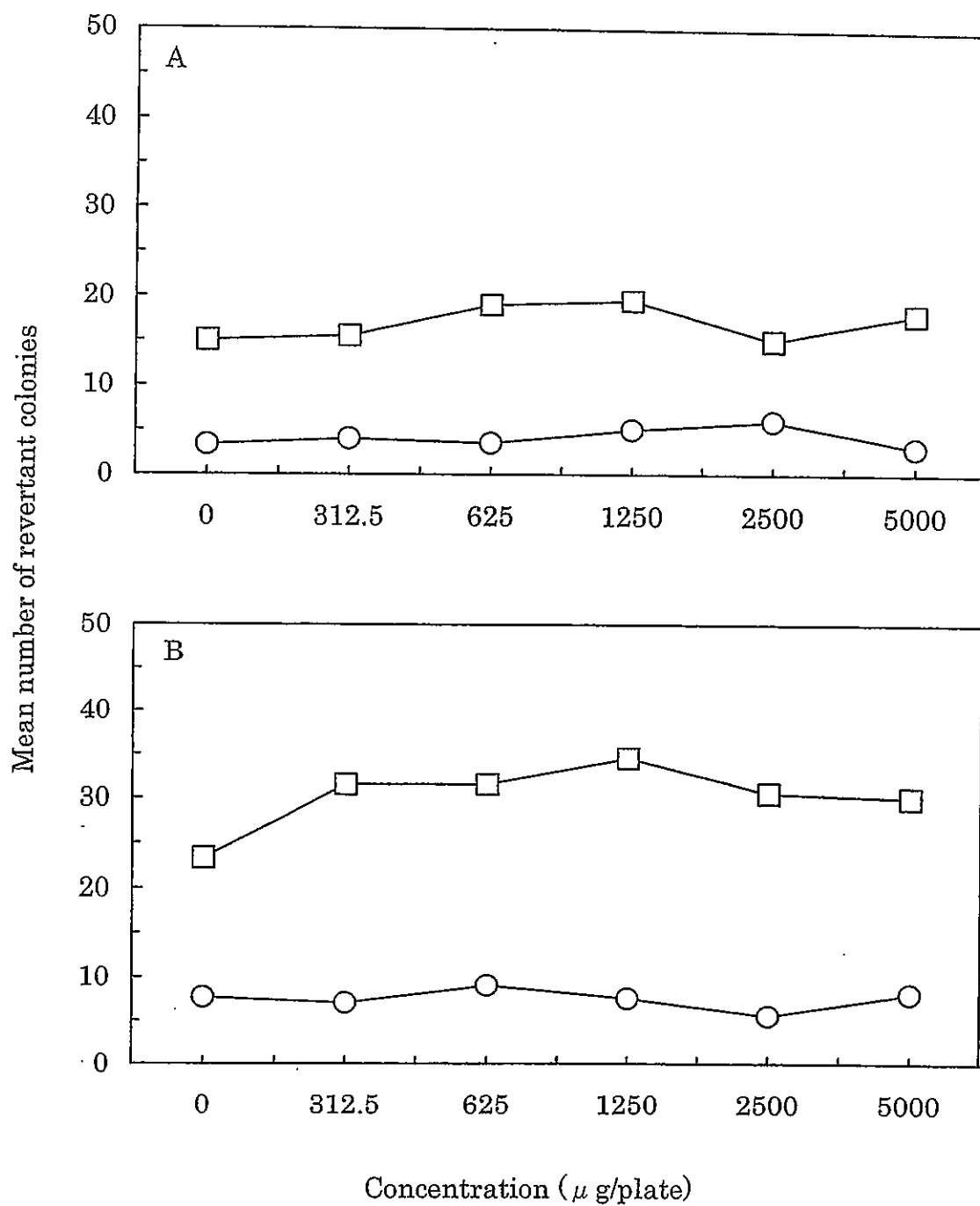


Fig. 2. Dose depending effect of LACTO CREATE (power no izumi) in the strains of frameshift (Mutagenicity test).

A: Without metabolic activation system (-S9mix)

B: With metabolic activation system (+S9mix)

□ : TA98 ; ○ : TA1537

Study No. H-05304

Appendix 1. Reverse mutation test of LACTO CREATE(power no izumi) in *S.typhimurium* and *E.coli*
(Dose determination test)

With(+) or Without(-) S9 mix	Test substance concentration (μ g/plate)	Number of revertants(number of colonies/plate) ^{a)}				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
S9mix (-)	Solvent control	140 157 (149)	10 9 (10)	39 36 (38)	22 25 (24)	4 3 (4)
	5	138 162 (150)	4 7 (6)	44 44 (44)	15 24 (20)	3 3 (3)
	10	130 126 (128)	7 7 (7)	33 43 (38)	21 16 (19)	3 5 (4)
	50	163 153 (158)	13 8 (11)	45 39 (42)	20 22 (21)	4 6 (5)
	100	158 157 (158)	9 7 (8)	39 33 (36)	28 22 (25)	5 3 (4)
	500	129 128 (129)	16 9 (13)	38 44 (41)	29 23 (26)	3 3 (3)
	1000	126 165 (146)	15 11 (13)	24 45 (35)	20 16 (18)	3 5 (4)
	5000	135 164 (150)	9 6 (8)	45 43 (44)	24 17 (21)	6 5 (6)
	S9mix (+)	Solvent control	157 176 (167)	13 10 (12)	46 43 (45)	37 23 (30)
5		159 150 (155)	14 16 (15)	57 48 (53)	23 38 (31)	6 5 (6)
10		165 157 (161)	12 10 (11)	52 38 (45)	20 29 (25)	7 10 (9)
50		168 177 (173)	8 12 (10)	40 50 (45)	26 34 (30)	9 5 (7)
100		165 151 (158)	8 12 (10)	45 46 (46)	28 32 (30)	8 8 (8)
500		147 182 (165)	9 8 (9)	54 57 (56)	32 35 (34)	7 8 (8)
1000		154 175 (165)	10 13 (12)	41 48 (45)	26 30 (28)	5 7 (6)
5000		173 173 (173)	10 12 (11)	46 44 (45)	25 32 (29)	12 11 (12)
Positive control not requiring S9 mix		Name	AF-2	SA	AF-2	AF-2
	Concentration (μ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	641 634 (638)	526 534 (530)	187 182 (185)	389 397 (393)	444 469 (457)
Positive control requiring S9 mix	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (μ g/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	918 973 (946)	231 254 (243)	1107 1133 (1120)	531 551 (541)	233 253 (243)

a) : The average number of colonies in each concentration.

Solvent : Distilled water for injection

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA: Sodium azide, 9-AA: 9-Aminoacridine,

2-AA: 2-Aminoanthracene

Study No. H-05304

Appendix 2. Reverse mutation test of LACTO CREATE(power no izumi) in *S.typhimurium* and *E.coli* (Mutagenicity test)

With(+) or Without(-) S9 mix	Test substance concentration (μ g/plate)	Number of revertants(number of colonies/plate) ^{a)}				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
S9mix (-)	Solvent control	155	8	24	14	3
		155 (150)	10 (9)	36 (29)	15 (15)	3 (3)
		140	9	26	16	4
	312.5	144	9	33	14	3
		157 (151)	13 (11)	37 (35)	17 (16)	5 (4)
	625	146	10	46	18	3
		141 (144)	12 (11)	34 (40)	20 (19)	4 (4)
1250	138	10	31	25	4	
	142 (140)	15 (13)	37 (34)	14 (20)	6 (5)	
2500	138	13	30	18	5	
	147 (143)	13 (13)	36 (33)	12 (15)	7 (6)	
5000	138	10	25	17	3	
	132 (135)	11 (11)	33 (29)	19 (18)	3 (3)	
S9mix (+)	Solvent control	159	10	34	27	6
		159 (161)	12 (11)	54 (44)	25 (23)	9 (8)
		165	12	45	18	8
	312.5	159	9	49	31	9
		160 (160)	15 (12)	45 (47)	32 (32)	5 (7)
	625	168	16	44	37	8
		171 (170)	9 (13)	34 (39)	26 (32)	10 (9)
1250	171	9	37	31	7	
	167 (169)	14 (12)	35 (36)	38 (35)	8 (8)	
2500	154	9	38	27	5	
	171 (163)	10 (10)	38 (38)	34 (31)	6 (6)	
5000	146	11	39	31	8	
	162 (154)	13 (12)	39 (39)	29 (30)	8 (8)	
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (μ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	556 534 (545)	567 537 (552)	234 237 (236)	474 463 (469)	415 480 (448)
Positive control requiring S9 mix	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (μ g/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1106 1119 (1113)	230 247 (239)	1141 1133 (1137)	585 496 (541)	244 270 (257)

a) : The average number of colonies in each concentration.

Solvent : Distilled water for injection

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA: Sodium azide, 9-AA: 9-Aminoacridine,

2-AA: 2-Aminoanthracene

Study No. H-05304

Attached sheet 1. Historical background data (Preincubation method)

Negative control	Distilled water for injection									
S9 mix	-					+				
Tester strain	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
N	25	25	25	25	25	28	25	25	28	25
Mean	123	9	29	20	8	136	11	34	28	11
S.D.	12	2	6	4	2	13	2	7	5	2
2S.D.	24	4	12	8	4	26	4	14	10	4
Mean -2S.D.	99	5	17	12	4	110	7	20	18	7
Mean+2S.D.	147	13	41	28	12	162	15	48	38	15

Positive control	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S9 mix	-					+				
Tester strain	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
N	114	114	112	114	118	114	112	112	114	116
Mean	553	516	214	418	442	1019	239	1005	502	237
S.D.	51	43	29	29	44	78	22	73	46	23
2S.D.	102	86	58	58	88	156	44	146	92	46
Mean -2S.D.	451	430	156	360	354	863	195	859	410	191
Mean+2S.D.	655	602	272	476	530	1175	283	1151	594	283

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA :Sodium azide, 9-AA:9-Aminoacridine,
2-AA: 2-Aminoanthracene

Data collection period : Negative control July 1,2005 ~ October 31,2005
 Positive control June 1,2005 ~ October 31,2005

Study No. H-05304