

9. 統計処理

体重、摂餌量、黄体数、着床痕数、出産児数、死産児数、性比、平均性周期、妊娠期間、着床率、算出率、出生率、外形異常発現率、新生児の4日生存率、器官重量、器官重量・体重比、血液学的および血液化学的検査値については、まず、Bartlettの等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置分散分析を行った。分散が有意で各群の標本数が同数の場合はDunnnettの多重比較検定、各群の標本数が異なる場合はSchefféの多重比較検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。Bartlettの等分散検定で不等分散の場合はKruskal-Wallisの順位検定を実施した。有意で各群の標本数が同数の場合はDunnnettの順位検定、各群の標本数が異なる場合はSchefféの順位検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。出産率、交尾率、受胎率については χ^2 検定を行った。病理組織学検査で群間に程度差が認められた場合は累積カイ二乗検定を行った。なお、哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は* : $P < 0.05$ および** : $P < 0.01$ とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡および一般状態

死亡例は、雌雄ともに投与期間を通じいずれの群にも観察されなかった。

一般状態の観察では、雌雄とも被験物質投与による変化は認められなかった。自然発生性の所見として雄の100 mg/kg群で腹腔内の腫瘍および泌尿生殖器の出血が投与7週に1例、眼分泌物が投与4週に、また切歯異常（上顎切歯折れ）が投与3週に同一個体の1例に観察された。雌では、眼分泌物が対照群で妊娠8日に1例および100 mg/kg群で妊娠13日から哺育1日にかけて1例に観察された。

2) 体重 (Table 1~2)

雌雄ともに各群の体重はほぼ同様な推移を示し、対照群と被験物質投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。

Table 1. Body weight change of male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals		12	12	12	12
Days of experiment	0	323 ± 9.6	322 ± 11.7	323 ± 12.7	323 ± 9.4
	7	343 ± 16.5	348 ± 8.8	346 ± 17.2	346 ± 15.6
	14	362 ± 19.0	362 ± 18.1	367 ± 20.1	370 ± 20.6
	21	383 ± 19.3	381 ± 18.3	388 ± 21.1	387 ± 21.1
	28	398 ± 21.6	399 ± 20.1	403 ± 23.5	401 ± 23.7
	35	404 ± 22.2	402 ± 20.9	410 ± 25.6	407 ± 28.9
	42	415 ± 23.8	417 ± 25.4	425 ± 28.5	419 ± 30.8
Gain 0-42		92 ± 20.6	95 ± 25.5	101 ± 20.4	96 ± 24.9

Values are expressed as g, Mean ± S.D.

Table 2. Body weight change of female rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Before mating period					
No. of animals		12	12	12	12
Days of experiment	0	210 ± 6.6	209 ± 6.0	210 ± 5.6	210 ± 6.0
	7	223 ± 8.5	225 ± 8.7	224 ± 7.4	224 ± 9.1
	14	238 ± 13.2	239 ± 10.1	238 ± 6.3	239 ± 12.7
	Gain 0-14	28 ± 10.4	29 ± 7.5	28 ± 4.8	29 ± 9.4
Gestation period					
No. of dams		12	10	12	11
Days of gestation	0	242 ± 15.6	242 ± 13.1	242 ± 6.6	243 ± 13.3
	7	270 ± 19.4	270 ± 15.4	270 ± 9.5	266 ± 18.1
	14	296 ± 19.6	295 ± 14.9	300 ± 11.7	294 ± 24.1
	21	365 ± 28.0	368 ± 19.9	378 ± 16.9	367 ± 34.6
	Gain 0-21	123 ± 23.8	125 ± 12.8	136 ± 15.4	123 ± 25.2
Lactation period					
No. of dams		11	10	12	11
Days of lactation	1	267 ± 19.4	260 ± 17.1	274 ± 15.0	272 ± 21.7
	4	273 ± 14.8	273 ± 16.0	281 ± 13.9	279 ± 25.5
	Gain 1-4	6 ± 5.7	13 ± 8.4	7 ± 6.4	8 ± 10.4

Values are expressed as g, Mean ± S.D.

3) 摂餌量

雌雄ともに各群の摂餌量はほぼ同程度で、対照群と被験物質投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。

4) 雄の血液学的検査 (Table 3)

対照群と被験物質投与群との間で差の認められた検査項目はなかった。

5) 雄の血液化学検査 (Table 4)

300および1,000 mg/kgでは、対照群と比べ総ビリルビン、総蛋白およびアルブミン量が増加し、さらに1,000 mg/kg群で血糖値が減少した。その他、100および300 mg/kg

kg群でGOTの減少、100 mg/kg群で γ -GPTの増加、100、300および1,000 mg/kg群でカルシウムの増加、300 mg/kg群で無機リンの増加、100 mg/kg群でカリウムの減少が認められたが、いずれも軽微な変化か、用量依存性のない変化であった。

6) 器官重量 (Table 5~6)

雄では、300および1,000 mg/kg群で対照群に比べ肝臓の実重量および相対重量がともに増加した。さらに、1,000 mg/kg群では、腎臓の実重量および相対重量がともに増加し、300 mg/kg群でも統計学的有意差はないものの増加傾向が認められた。雌では、実重量および相対重量とも対照群と被験物質投与群との間で統計学的有意差が認められた器官はなかった。

Table 3. Hematology of male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol.

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
HCT(%)	46.6 $\pm$ 1.7	46.7 $\pm$ 3.0	47.2 $\pm$ 1.9	44.7 $\pm$ 2.4
HGB(g/dl)	14.8 $\pm$ 0.5	14.7 $\pm$ 0.9	14.8 $\pm$ 0.6	14.2 $\pm$ 0.5
RBC($\times 10^6$ /mm ³)	9.61 $\pm$ 0.30	9.47 $\pm$ 0.72	9.57 $\pm$ 0.46	9.14 $\pm$ 0.48
MCV(μ m ³)	48.5 $\pm$ 1.4	49.4 $\pm$ 1.8	49.4 $\pm$ 1.5	48.9 $\pm$ 1.2
MCH(pg)	15.4 $\pm$ 0.4	15.6 $\pm$ 0.7	15.5 $\pm$ 0.6	15.6 $\pm$ 0.5
MCHC(%)	31.7 $\pm$ 0.4N	31.5 $\pm$ 0.5	31.4 $\pm$ 0.5	31.9 $\pm$ 1.0
PLT($\times 10^3$ /mm ³)	1172 $\pm$ 88	1232 $\pm$ 188	1304 $\pm$ 126	1274 $\pm$ 110
WBC($\times 10^3$ /mm ³)	6.7 $\pm$ 1.3	7.0 $\pm$ 1.5	6.8 $\pm$ 0.9	7.0 $\pm$ 1.3
Differential leukocyte counts(%)				
NEUT	29 $\pm$ 7N	29 $\pm$ 9	27 $\pm$ 5	29 $\pm$ 4
LYMPH	66 $\pm$ 8	67 $\pm$ 9	68 $\pm$ 5	66 $\pm$ 4
MONO	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1
EOSN	2 $\pm$ 1N	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0
BASO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
LUC	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
Reticulocyte(% _{un})	11 $\pm$ 3N	14 $\pm$ 11	11 $\pm$ 6	10 $\pm$ 3

Values are expressed as Mean $\pm$ S.D.

LUC : Large unstained cells

N : Non parametric analysis

Table 4. Blood chemistry of male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Glucose(mg/dl)	152 $\pm$ 7N	154 $\pm$ 17	164 $\pm$ 26	140 $\pm$ 10 **
T.bilirubin(mg/dl)	0.25 $\pm$ 0.02N	0.26 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.02 *	0.32 $\pm$ 0.04 **
BUN(mg/dl)	15.5 $\pm$ 2.4	17.7 $\pm$ 4.4	18.2 $\pm$ 3.0	18.8 $\pm$ 2.6
Creatinine(mg/dl)	0.64 $\pm$ 0.04	0.66 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.09	0.68 $\pm$ 0.06
T.protein(g/dl)	6.02 $\pm$ 0.18	6.07 $\pm$ 0.11	6.29 $\pm$ 0.16 **	6.42 $\pm$ 0.19 **
Albumin(g/dl)	3.25 $\pm$ 0.12	3.31 $\pm$ 0.09	3.46 $\pm$ 0.16 **	3.52 $\pm$ 0.14 **
A/G	1.18 $\pm$ 0.05	1.21 $\pm$ 0.06	1.23 $\pm$ 0.08	1.22 $\pm$ 0.05
Potassium(mmol/l)	4.87 $\pm$ 0.23	4.52 $\pm$ 0.41 *	4.91 $\pm$ 0.38	4.72 $\pm$ 0.24
Chloride(mmol/l)	105.5 $\pm$ 1.3	106.8 $\pm$ 1.8	106.5 $\pm$ 1.7	105.2 $\pm$ 1.2
Calcium(mg/dl)	9.34 $\pm$ 0.31	9.64 $\pm$ 0.24 *	9.81 $\pm$ 0.42 **	9.67 $\pm$ 0.27 *
I.phosphate(mg/dl)	5.37 $\pm$ 0.67	5.75 $\pm$ 0.52	6.43 $\pm$ 0.96 **	5.68 $\pm$ 0.48
GOT(U/l)	49 $\pm$ 10N	38 $\pm$ 4 **	42 $\pm$ 10 *	43 $\pm$ 8
GPT(U/l)	24 $\pm$ 5	21 $\pm$ 5	23 $\pm$ 3	20 $\pm$ 2
Gamma-GTP(U/l)	0.5 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.5 **	0.3 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.4

Values are expressed as Mean $\pm$ S.D.

Significantly different from control group; *: p<0.05 **: p<0.01

N : Non parametric analysis

Table 5. Absolute and relative organ weight of male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals		12	12	12	12
Body weight	(g)	391 ± 23	395 ± 23	399 ± 27	392 ± 30
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	303 ± 70	333 ± 36	286 ± 57	313 ± 82
Liver	(g)	11.23 ± 1.15	11.49 ± 0.96	12.52 ± 1.18 *	13.07 ± 1.43 **
Kidneys	(g)	2.61 ± 0.18	2.70 ± 0.16 (11)	2.83 ± 0.24	2.94 ± 0.33 *
Testes	(g)	3.41 ± 0.16	3.45 ± 0.18	3.42 ± 0.15	3.47 ± 0.22
Epididymides	(g)	1.18 ± 0.08	1.25 ± 0.10	1.19 ± 0.10	1.23 ± 0.14
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	77.170 ± 16.376	84.433 ± 8.928	71.518 ± 12.979	79.578 ± 18.122
Liver	(g%)	2.865 ± 0.164	2.911 ± 0.217	3.137 ± 0.154 **	3.331 ± 0.170 **
Kidneys	(g%)	0.666 ± 0.037	0.678 ± 0.046 (11)	0.711 ± 0.049	0.749 ± 0.052 **
Testes	(g%)	0.873 ± 0.058	0.874 ± 0.053	0.861 ± 0.045	0.889 ± 0.092
Epididymides	(g%)	0.301 ± 0.021	0.316 ± 0.021	0.299 ± 0.025	0.315 ± 0.038

Values are expressed as Mean ± S.D.

Values in parentheses are expressed number of animals measured

Significantly different from control group; *: p<0.05 **: p<0.01

Table 6. Absolute and relative organ weight of female rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals		11	10	12	11
Body weight	(g)	273 ± 15	273 ± 16	281 ± 14	279 ± 25
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	197 ± 52	178 ± 44	208 ± 53	201 ± 46
Liver	(g)	10.85 ± 0.91	11.36 ± 1.21	10.92 ± 1.25	11.33 ± 1.41
Kidneys	(g)	1.86 ± 0.19	1.98 ± 0.20	2.00 ± 0.21	1.95 ± 0.22
Ovaries	(mg)	100 ± 6N	98 ± 7	100 ± 13	102 ± 18
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	71.979 ± 19.057	65.132 ± 14.151	73.626 ± 16.446	71.251 ± 12.240
Liver	(g%)	3.965 ± 0.170	4.160 ± 0.258	3.884 ± 0.369	4.050 ± 0.306
Kidneys	(g%)	0.682 ± 0.063	0.726 ± 0.049	0.710 ± 0.063	0.697 ± 0.042
Ovaries	(mg%)	36.769 ± 2.106N	36.063 ± 2.926	35.722 ± 4.349	36.572 ± 6.152

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 7. Summary of gross findings in male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of animals necropsied		12	12	12	12
Organ	Findings				
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	enlarged	0	0	0	2
abdominal cavity	mass	1	0	0	0
URINARY SYSTEM					
kidney	mass	0	1	0	0
	white patch/zone	0	1	0	0

Table 8. Summary of gross findings in female rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of animals necropsied	11	10	12	11
Organ	Findings			
RESPIRATORY SYSTEM				
lung	colored patch/zone	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM				
liver	nodule	0	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM				
ovary	cyst	0	1	0

7) 剖検所見 (Table 7~8)

雄では、肝臓の肥大が1,000 mg/kg群で12例中2例に観察された。その他、自然発生性の病変と考えられる所見として、腹腔内の塊（脂肪壊死）が対照群に1例、腎臓の腫瘍および白色斑／区域が100 mg/kg群の同一個体1例に観察された。なお、これらの雄動物うち、交尾の成立はしなかった雄は100 mg/kg群に1例、妊娠を成立させなかった雄は100および1,000 mg/kg群に各1例認められたが、特に生殖系器官の異常は認められなかった。

交尾の成立しなかった雌は100 mg/kg群に1例認められたが、異常所見は観察されなかった。妊娠の成立しなかった雌は100および1,000 mg/kg群の各1例に認められたが、被験物質投与の影響と考えられる異常所見は観察されなかった。

哺育4日の母動物の剖検では、被験物質投与による影響が示唆される所見は観察されなかった。自然発生性の病変と考えられる所見として、肺の有色斑／区域が対照群および100 mg/kg群にそれぞれ1例、肝臓の結節が100 mg/kg群に1例および卵巣の嚢胞が300 mg/kg群に1例観察された。

Table 9. Summary of histological findings in male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000													
No. of animals sacrificed	12	10	12	11													
No. of animals necropsied	12	10	12	11													
No. of animals examined histologically	12	10	12	11													
Organ	Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
CARDIOVASCULAR SYSTEM																	
heart		(12)				(0)				(0)				(11)			
	infiltration/cellular	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM																	
spleen		(12)				(0)				(0)				(11)			
	deposit of pigment	-	12	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0	0
DIGESTIVE SYSTEM																	
liver		(12)				(0)				(0)				(11)			
	cytological alteration	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	fatty change	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	granulation	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
	lymphocytic infiltration	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	bile duct hyperplasia	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
peritoneum		(1)				(0)				(0)				(0)			
	granulation	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URINARY SYSTEM																	
kidney		(12)				(10)				(12)				(11)			
	basophilic change	-	10	0	0	-	9	1	0	-	11	0	0	-	7	4	0
	deposit of calcium	-	3	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	2	0	0
	eosinophilic body	-	12	0	0	-	10	0	0	-	12	0	0	-	11	0	0
	hyaline droplet	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	4	0	0
	protein cast	-	1	0	0	-	1	0	0	-	2	0	0	-	5	0	0
	lymphocytic infiltration	-	0	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
	fibrosis	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
	#nephroblastoma	0	-	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
ENDOCRINE SYSTEM																	
adrenal gland		(12)				(0)				(0)				(11)			
	vacuolic change	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

(): No. of animals examined microscopically at this site.

Table 10. Summary of histological findings in female rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level	(mg/kg)	0				100				300				1000			
No. of animals sacrificed		11				10				12				11			
No. of animals necropsied		11				10				12				11			
No. of animals examined histologically		11				0				0				11			
Organ	Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
CARDIOVASCULAR SYSTEM																	
heart		(11)				(0)				(0)				(11)			
	deposit of calcium	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	infiltration/cellular	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM																	
spleen		(11)				(0)				(0)				(11)			
	deposit of pigment	-	8	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	0	0
	hematopoiesis, increased	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
thymus		(11)				(0)				(0)				(11)			
	atrophy	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	squamous metaplasia	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0
RESPIRATORY SYSTEM																	
lung		(1)				(0)				(0)				(0)			
	hemorrhage	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	granulation	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DIGESTIVE SYSTEM																	
liver		(11)				(0)				(0)				(11)			
	cytological alteration	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	granulation	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	extramedullary hematopoiesis	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0
URINARY SYSTEM																	
kidney		(11)				(0)				(0)				(11)			
	basophilic change	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	deposit of calcium	-	8	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0	0
	protein cast	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	lymphocytic infiltration	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																	
adrenal gland		(11)				(0)				(0)				(11)			
	vacuolic change	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

(): No. of animals examined microscopically at this site.

8) 病理組織学検査 (Table 9~10)

交尾成立した雄および自然分娩した雌は、対照群、100、300および1,000 mg/kg群でそれぞれ12、10、12、11例および11、10、12、11例であった。被験物質投与によると考えられる所見として、対照群に比べ1,000 mg/kg群の雄で腎臓の蛋白円柱が多い傾向を示したほか、同群の硝子滴変性は11例中4例と発生数の増加を示した。また、同群の腎尿細管上皮の中等度好塩基性化が11例中4例に認められた。腎臓については高用量で変化が認められたため、100および300 mg/kg群について鏡検した結果、対照群との間に差異は認められなかった。その他の所見は対照群との間に差異は認められなかったが、2例以上の発生を示したものは次の通りであった。腎臓の好酸性小体が雄の全例に、脾臓の色素沈着が雌雄の多数例に、副腎の空胞化が雄の多数例に、腎臓の石灰沈着が雌の多数例にそれぞれ観察された。また、心臓の細胞浸潤、肝臓の細胞変性・小肉芽巣、腎臓のリンパ球浸潤が雌雄で、肝臓のリンパ球浸潤、腎臓の石灰沈着が雄で、脾臓の造血亢進、胸腺の扁平上皮化生、肝臓の髄外造血が雌でいずれも軽度ながら少数例に認められた。なお、

腫瘍性病変として、100 mg/kg群の雄の1例に腎芽腫が観察された。

交尾の成立しなかった動物は100 mg/kg群で雌雄各1例認められた。これらの動物では、脾臓の色素沈着、腎臓の尿細管上皮好塩基性化・石灰沈着が雌雄に、心臓の石灰沈着、肝臓の小肉芽巣、腎臓の好酸性小体・蛋白円柱、副腎の空胞化が雄に観察された。

妊娠を成立させなかった雄および妊娠の成立しなかった雌は、100および1,000 mg/kg群で雌雄各1例認められた。これらの動物では、脾臓の色素沈着、肝臓の小肉芽巣が雌雄に、心臓の細胞浸潤、胸腺の扁平上皮化生、腎臓の尿細管上皮好塩基性化・好酸性小体・リンパ球浸潤、副腎の空胞化が雄に、腎臓の石灰沈着が雌にそれぞれ認められた。

分娩が認められなかった雌は対照群の1例に認められた。この動物では、脾臓の色素沈着、腎臓の石灰沈着・リンパ球浸潤が観察された。

2. 生殖発生毒性

1) 交尾および受胎能 (Table 11)

交尾は、100 mg/kg群を除き対照群を含むすべての群で全例成立した。100 mg/kg群では1組が交尾不成立で、交尾率は91.7%であった。受胎は、対照群および300 mg/kg群の交尾成立の雌全例で成立し、100 mg/kg群では11例中10例、1,000 mg/kg群では12例中11例で成立した。

性周期観察では、100 mg/kg群の1例に偽妊娠と考えられる性周期の停止（連続した発情休止期像）が11日間連続して認められたが交尾はその後成立した。その他、1,000 mg/kg群の平均性周期は対照群の4.0日に比べて4.3日と長

く、統計学的有意差が認められた。

2) 分娩および哺育 (Table 12)

分娩時観察では、いずれの指標においても対照群と被験物質投与群との間に統計学的に有意差は認められなかった。すなわち、各群の妊娠期間、黄体数、着床痕数、出産児数、出産生児数、性比、4日生存児数および死産児数はほぼ同様な値を示し、出産率、着床率、分娩率、出生率および4日生存率に群間差は認められなかった。その他、対照群の1例に分娩徴候が認められなかったため、妊娠25日に剖検した。その結果、死亡胎児1例の子宮内残留が認められた。

Table 11. Summary of reproductive performance in rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	11	12	12
No. of pregnant females	12	10	12	11
Copulation index (%) ^{a)}	100	91.7	100	100
Fertility index (%) ^{b)}	100	90.9	100	91.7
Estrus cycle (days, mean $\pm$ S.D.)	4.0 $\pm$ 0.1N	4.0 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.4 *

a): (Number of animals with successful copulation / number of animals mated) $\times$ 100

b): (Number of pregnant animals / number of animals with successful copulation) $\times$ 100

Significantly different from control group; *: $P < 0.05$

N: Non parametric analysis

Table 12. Findings of delivery in dams treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol and observations on their pups(F1)

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of dams observed	12	10	12	11
No. of dams delivered live pups	11	10	12	11
Duration of gestation (Mean $\pm$ S.D.)	21.1 $\pm$ 0.3	21.3 $\pm$ 0.5	21.3 $\pm$ 0.5	21.4 $\pm$ 0.5
No. of total corpora lutea (Mean $\pm$ S.D.)	170(15.5 $\pm$ 1.0)	157(15.7 $\pm$ 1.2)	193(16.1 $\pm$ 1.7)	164(14.9 $\pm$ 1.8)
No. of total implants (Mean $\pm$ S.D.)	163(14.8 $\pm$ 1.2)N	152(15.2 $\pm$ 1.3)	184(15.3 $\pm$ 1.2)	153(13.9 $\pm$ 2.7)
No. of total pups born (Mean $\pm$ S.D.)	152(13.8 $\pm$ 1.2)N	141(14.1 $\pm$ 1.6)	168(14.0 $\pm$ 2.8)	141(12.8 $\pm$ 2.2)
No. of total live pups born (Mean $\pm$ S.D.)	151(13.7 $\pm$ 1.2)	141(14.1 $\pm$ 1.6)	168(14.0 $\pm$ 2.8)	141(12.8 $\pm$ 2.2)
Male	67(6.1 $\pm$ 1.9)	76(7.6 $\pm$ 1.8)	83(6.9 $\pm$ 2.5)	66(6.0 $\pm$ 2.2)
Female	84(7.6 $\pm$ 2.5)	65(6.5 $\pm$ 1.6)	85(7.1 $\pm$ 2.5)	75(6.8 $\pm$ 2.4)
Sex ratio (Male/Female)	0.80(67/ 84)	1.17(76/ 65)	0.98(83/ 85)	0.88(66/ 75)
No. of live pups on day 4 (Mean $\pm$ S.D.)				
Male	65(5.9 $\pm$ 2.0)	76(7.6 $\pm$ 1.8)	81(6.8 $\pm$ 2.4)	65(5.9 $\pm$ 2.2)
Female	81(7.4 $\pm$ 2.7)	61(6.1 $\pm$ 1.1)	84(7.0 $\pm$ 2.4)	73(6.6 $\pm$ 2.2)
No. of dead pups born (Mean $\pm$ S.D.)	1(0.1 $\pm$ 0.3)	0	0	0
Gestation index (%) ^{a)}	91.7	100	100	100
Implantation index (Mean $\pm$ S.D.) ^{b)}	95.9 $\pm$ 4.6	96.8 $\pm$ 3.4	95.7 $\pm$ 6.2	93.4 $\pm$ 14.0
Delivery index (Mean $\pm$ S.D.) ^{c)}	93.3 $\pm$ 5.1	92.8 $\pm$ 7.1	90.9 $\pm$ 15.6	92.7 $\pm$ 5.3
Birth index (Mean $\pm$ S.D.) ^{d)}	92.8 $\pm$ 6.1	92.8 $\pm$ 7.1	90.9 $\pm$ 15.6	92.7 $\pm$ 5.3
Viability index on day 4 (Mean $\pm$ S.D.) ^{e)}				
Male	97.0 $\pm$ 6.8	100.0 $\pm$ 0.0	97.9 $\pm$ 5.3	98.9 $\pm$ 3.8
Female	95.5 $\pm$ 7.8	95.2 $\pm$ 8.1	99.3 $\pm$ 2.4	97.4 $\pm$ 6.3

a): (Number of females with live pups / number of pregnant females) $\times$ 100

b): (Number of total implants / number of total corpora lutea) $\times$ 100

c): (Number of pups born / number of implants) $\times$ 100

d): (Number of live pups born / number of implants) $\times$ 100

e): (Number of live pups on day 4 after birth / number of live pups born) $\times$ 100

N: Non parametric analysis

3) 新生児の形態、体重および剖検所見

新生児の外表検査では、外傷（耳介、後肢）が100 mg/kg群の2例に観察されたのみで、その他異常は観察されなかった。

哺育1および4日の体重は雌雄ともに群間差がなく統計学的有意差は認められなかった。

死産児および哺育4日までの死亡児の剖検では、主要器官の異常は認められなかった。哺育4日の剖検では、肝臓の奇形結節（過形成）が300 mg/kg群の1例に観察されたのみでその他異常は観察されなかった。

考察

1. 反復投与毒性

一般状態には被験物質投与の影響は認められず、死亡例も観察されなかった。

体重および摂餌量は雌雄ともに群間で差はなく被験物質投与の影響は認められなかった。

雄の血液学的検査では、いずれの検査項目においても被験物質投与の影響と考えられる変化はなかった。血液化学的検査では、300および1,000 mg/kg群でアルブミンの増加に伴う総蛋白の増加および総ビリルビンの増加が認められ、さらに1,000 mg/kg群で血糖値の減少が認められた。これら、1,000 mg/kg群で認められたアルブミン、総蛋白および総ビリルビンの増加は、肝臓に対する影響を示唆するものであり、被験物質投与の影響と考えられた。

器官重量は雌においては被験物質投与の影響が認められなかったが、雄では300および1,000 mg/kg群で肝臓の実重量および相対重量が増加し、さらに1,000 mg/kg群で腎臓の実重量および相対重量が増加した。また、300 mg/kg群では統計学的有意差は認められないものの腎臓の実重量および相対重量が増加傾向を示した。肝臓重量の増加に関連する剖検所見として、雄の1,000 mg/kg群で12例中2例に肝臓の肥大が観察され、被験物質投与の影響と考えられた。組織学検査では、肝臓の肥大を裏付ける明確な形態的变化は認められず、光顕所見には現われない程度の機能的増大による肥大と考えられる。その他、腎臓の蛋白円柱と硝子滴変性が病変の程度としては軽度ではあるが雄の1,000 mg/kg群で発生数の増加または増加傾向を示した。また、同群の腎尿細管上皮の中等度好塩基性化は11例中4例に観察された。これら腎臓の変化は、被験物質投与による特異的な変化ではなく、対照群にも観察されるような自然発生的な病変が雄では被験物質投与により増強されたものと考えられた。分娩不能動物、交尾不成立動物および妊娠不成立動物の組織学検査では、それぞれの原因に関連すると考えられる異常所見は認められなかった。

以上のことから、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールは、300 mg/kg/day以上の投与で雄の場合、肝臓および腎臓重量の増加または増加傾向、また、1,000 mg/kg/day投与でアルブミンの増加に伴う総蛋白の増加および総ビリルビンの増加、血糖値の減少、腎臓の蛋白円柱、硝子滴変性数の増加または増加傾向、尿細管上皮の好塩基性化の程度の増強および肝臓の肥大を誘起した。雌では1,000 mg/kg/day投与によっても認められなかった。した

がって、反復投与毒性の最大無影響量は、雄では100 mg/kg/day、雌では1,000 mg/kg/dayと判断された。

2. 生殖発生毒性

交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。性周期観察で、1,000 mg/kg群の平均性周期に統計学的有意差が認められたが、1例が平均5.3日と長く、その他の動物では対照群と同様な性周期を示していることから被験物質投与の影響はないと判断された。

分娩時観察では、対照群の1例を除き、妊娠動物の全例が正常に分娩し、哺育期間を通じ被験物質投与の影響は認められなかった。また、新生児の外表検査でも被験物質投与によると考えられる異常はなく、体重も哺育4日まで群間に差はなく順調に増加した。

死産児および哺育4日までの死亡児ならびに哺育4日の剖検では、被験物質投与によると考えられる異常所見は認められなかった。

以上のことから、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールの雌雄の生殖に及ぼす影響および児動物の発生に及ぼす影響は、1,000 mg/kg/day投与によっても認められず、最大無影響量はともに1,000 mg/kg/dayと判断された。

文献

- 1) Govt. Reports Announcements & Index, NTIS/PB 89-215776 (1982).
- 2) C. G. Shayne and S.W. Carrol, "Statics and Experimental Design For Toxicologists," Telford Press, 1986.
- 3) 佐久間昭 "薬効評価 I-計画と解析一," 東京大学出版会, 1977.
- 4) 石居進, "生物統計学入門," 培風館, 1975.

連絡先：試験責任者 萩田孝一

(財) 食品農薬薬品安全性評価センター

〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜 582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence : Hagita, Koichi

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and

Pesticides (An-pyo Center), Japan

582-2 Shioshinden Arahama, Fukude-cho, Iwata-gun,

Shizuoka, 437-12, Japan

Tel 81-538-58-1266 Fax 81-538-58-1393

2, 2-ジメチル-1, 3-プロパンジオールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 2,2-Dimethyl-1,3-propanediol on Bacteria

要約

2, 2-ジメチル-1, 3-プロパンジオールの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は 50~5000 µg/プレート の用量で、本試験は 312.5~5000 µg/プレート の用量で試験を行った。

その結果、2 回の本試験とも、用いた 5 種類の検定菌において、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、2, 2-ジメチル-1, 3-プロパンジオールは、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）と判定された。

緒言

高生産量既存化学物質で、現在十分な安全性資料のない、2, 2-ジメチル-1, 3-プロパンジオールについて、OECD を中心として行われている国際協力による、安全性点検評価事業の一環として、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異¹⁾、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異²⁾を指標とした変異原の検出系である。試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和 62 年 3 月 31 日、環保業第 237 号、薬発第 306 号、62 基局第 303 号）および OECD 化学品試験法ガイドライン：471、472 に準拠し、化学物質 GLP（昭和 59 年 3 月 31 日、環保業第 39 号、薬発第 229 号、59 基局第 85 号、改訂昭和 63 年 11 月 18 日、環企研第 233 号、衛生第 38 号、63 基局第 823 号）に基づいて実施した。

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

Salmonella typhimurium TA100、*Salmonella typhimurium* TA1535、*Salmonella typhimurium* TA98、*Salmonella typhimurium* TA1537 の 4 菌株は 1975 年 10 月 31 日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学の B. N. Ames 博士から分与を受けた。

Escherichia coli WP2 *uvrA* 株は 1979 年 5 月 9 日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は、-80℃ 以下で凍結保存した。試験に際して、0.5% 塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス（Difco）を入れた L 字型試験管に種菌を接種し、37℃、10 時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

2, 2-ジメチル-1, 3-プロパンジオール（CAS No. 126-30-7、2,2-Dimethyl-1,3-propanediol）は分子量 104.17、融点 123~127℃、水溶性の白色結晶である。純度 99.15% のもの（ロット番号：1N01、三菱瓦斯化学株式会社製造）を（社）日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。

2, 2-ジメチル-1, 3-プロパンジオールは、蒸留水を用いて 50 mg/ml になるように調製した後、同溶媒でさらに公比 2 ないし 3 で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、秦野研究所において 2, 2-ジメチル-1, 3-プロパンジオール水溶液中での安定性試験を行った。安定性試験における溶媒は当研究所で実施される、培養細胞を用いる染色体異常試験と共通なことから、両試験における最高濃度（50 mg/ml）および最低濃度（2.5 mg/ml）の 2 濃度について室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後 3 時間における各 3 サンプルの平均含量は、それぞれ初期値の平均（0 時間）に対して 102% および 100% であった。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準（初回の測定平均値の 90% 以上）を満たしていた。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml、3.125 mg/ml の両溶液とも、含量は既定濃度に対し、101~104% であった。これらの値も当研究所の標準操作手順書の基準（平均含量は添加量の 85% 以上）を満たしていた。

以上の結果から、2, 2-ジメチル-1, 3-プロパンジオールは水溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

復帰変異試験

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

- AF-2 : フリルフラマイド (上野製薬 (株))
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業 (株))
9-AA : 9-アミノアクリジン (東京化成工業 (株))
2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業 (株))

AF-2、9-AA、2-AAはDMSO (和光純薬工業 (株)) に、SAは蒸留水に溶解して試験に用いた。

〔培地およびS9混液の組成〕

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比10:1の割合で混合した。

(A)	バクト・アガー (Difco)	0.6%
	塩化ナトリウム	0.5%
(B)*	L-ヒスチジン	0.5 mM
	ビオチン	0.5 mM

* WP2用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社の最少寒天培地を用いた。なお、培地1 lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カリウム	10g
リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5g
グルコース	20g
バクト・アガー (Difco)	15g

径90mmのシャーレ1枚あたり30mlを流して固めてある。

3) S9混液 (1 ml中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース・6リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml

** : 7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール (PB)、および5,6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与で酵素誘導して作製したS9 (キッコマン (株)) を用いた。

〔試験方法〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトップアガー2 ml、被験物質調製液0.1 ml、リン酸緩衝液0.5 ml (代謝活性化試験においてはS9混液0.5 ml)、検定菌液0.1 mlを混合したのち合成培地平板上に流固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに蒸留水、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌

ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定し、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。

〔判定基準〕

被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する (陽性) と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

50~5000 μ g/プレートの範囲で試験を実施したところ、直接試験および代謝活性化試験において抗菌性が認められなかったことから、本試験における最高用量を、すべての菌種において5000 μ g/プレートとし、公比2で5用量を設定した。

〔本試験〕

結果をTables 1、2に示した。2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールについて312.5~5000 μ g/プレートの範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接試験、代謝活性化試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての菌種において抗菌性は認められなかった。

以上の結果に基づき、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの (陰性) と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983)
- 2) M. H. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds.), Elsevier Science Publisher, New York, 1984, p161.

連絡先: 試験責任者 高島浩介

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257 神奈川県秦野市落合 729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence: Takatori, Kousuke

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan

Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol*

Group	Dose (μ g/plate)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type									Frameshift type					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98		TA1537			
Solvent control	-	-	131 (130 $\pm$)	131 (130 $\pm$)	128 (1.7)	14 (16 $\pm$)	15 (16 $\pm$)	19 (2.6)	11 (15 $\pm$)	18 (15 $\pm$)	15 (3.5)	29 (22 $\pm$)	22 (22 $\pm$)	14 (7.5)	6 (9 $\pm$)	8 (9 $\pm$)	12 (3.1)
Test substance	312.5	-	138 (139 $\pm$)	144 (139 $\pm$)	134 (5.0)	19 (14 $\pm$)	7 (14 $\pm$)	17 (6.4)	8 (11 $\pm$)	15 (11 $\pm$)	9 (3.8)	19 (20 $\pm$)	22 (20 $\pm$)	19 (1.7)	6 (8 $\pm$)	8 (8 $\pm$)	10 (2.0)
	625	-	139 (141 $\pm$)	151 (141 $\pm$)	134 (8.7)	15 (11 $\pm$)	9 (11 $\pm$)	8 (3.8)	14 (11 $\pm$)	8 (11 $\pm$)	11 (3.0)	21 (23 $\pm$)	23 (23 $\pm$)	25 (2.0)	5 (6 $\pm$)	9 (6 $\pm$)	4 (2.6)
	1250	-	125 (123 $\pm$)	120 (123 $\pm$)	124 (2.6)	9 (8 $\pm$)	11 (8 $\pm$)	5 (3.1)	11 (11 $\pm$)	9 (11 $\pm$)	12 (1.5)	16 (17 $\pm$)	17 (17 $\pm$)	18 (1.0)	6 (6 $\pm$)	7 (6 $\pm$)	6 (0.6)
	2500	-	123 (124 $\pm$)	126 (124 $\pm$)	124 (1.5)	10 (9 $\pm$)	8 (9 $\pm$)	9 (1.0)	7 (10 $\pm$)	11 (10 $\pm$)	11 (2.3)	15 (22 $\pm$)	25 (22 $\pm$)	26 (6.1)	8 (7 $\pm$)	8 (7 $\pm$)	4 (2.3)
	5000	-	126 (117 $\pm$)	121 (117 $\pm$)	105 (11.0)	14 (11 $\pm$)	9 (11 $\pm$)	10 (2.6)	9 (10 $\pm$)	6 (10 $\pm$)	14 (4.0)	23 (23 $\pm$)	21 (23 $\pm$)	26 (2.5)	7 (6 $\pm$)	5 (6 $\pm$)	7 (1.2)
Solvent control	+	+	117 (127 $\pm$)	131 (127 $\pm$)	132 (8.4)	13 (16 $\pm$)	10 (16 $\pm$)	24 (7.4)	16 (17 $\pm$)	13 (17 $\pm$)	21 (4.0)	29 (37 $\pm$)	42 (37 $\pm$)	39 (6.8)	11 (15 $\pm$)	14 (15 $\pm$)	19 (4.0)
Test substance	312.5	+	119 (130 $\pm$)	141 (130 $\pm$)	129 (11.0)	19 (12 $\pm$)	9 (12 $\pm$)	7 (6.4)	15 (13 $\pm$)	15 (13 $\pm$)	10 (2.9)	40 (38 $\pm$)	35 (38 $\pm$)	39 (2.6)	8 (9 $\pm$)	13 (9 $\pm$)	5 (4.0)
	625	+	133 (144 $\pm$)	158 (144 $\pm$)	141 (12.8)	15 (13 $\pm$)	14 (13 $\pm$)	11 (2.1)	14 (13 $\pm$)	11 (13 $\pm$)	15 (2.1)	41 (38 $\pm$)	38 (38 $\pm$)	36 (2.5)	12 (11 $\pm$)	8 (11 $\pm$)	12 (2.3)
	1250	+	135 (130 $\pm$)	150 (130 $\pm$)	105 (22.9)	6 (12 $\pm$)	15 (12 $\pm$)	14 (4.9)	12 (13 $\pm$)	13 (13 $\pm$)	14 (1.0)	38 (37 $\pm$)	38 (37 $\pm$)	35 (1.7)	11 (8 $\pm$)	7 (8 $\pm$)	7 (2.3)
	2500	+	147 (130 $\pm$)	116 (130 $\pm$)	128 (15.6)	14 (9 $\pm$)	6 (9 $\pm$)	7 (4.4)	14 (12 $\pm$)	8 (12 $\pm$)	14 (3.5)	34 (34 $\pm$)	29 (34 $\pm$)	39 (5.0)	12 (7 $\pm$)	4 (7 $\pm$)	5 (4.4)
	5000	+	147 (151 $\pm$)	147 (151 $\pm$)	159 (6.9)	11 (10 $\pm$)	10 (10 $\pm$)	10 (0.6)	14 (14 $\pm$)	13 (14 $\pm$)	14 (0.6)	29 (28 $\pm$)	28 (28 $\pm$)	28 (0.6)	5 (8 $\pm$)	8 (8 $\pm$)	10 (2.5)
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Dose (μ g/plate)																
	Number of colonies /plate		698 (685 $\pm$)	665 (685 $\pm$)	691 (17.4)	204 (217 $\pm$)	250 (217 $\pm$)	196 (29.1)	286 (259 $\pm$)	252 (259 $\pm$)	239 (24.3)	605 (588 $\pm$)	582 (588 $\pm$)	576 (15.3)	2597 (2453 $\pm$)	2208 (2453 $\pm$)	2554 (213.3)
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Dose (μ g/plate)																
	Number of colonies /plate		844 (844 $\pm$)	834 (844 $\pm$)	855 (10.5)	231 (222 $\pm$)	194 (222 $\pm$)	242 (25.1)	520 (549 $\pm$)	573 (549 $\pm$)	553 (26.8)	329 (335 $\pm$)	353 (335 $\pm$)	323 (15.9)	189 (199 $\pm$)	242 (199 $\pm$)	167 (38.6)

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
 *:Purity was 99.15%