OECD/OCDE

1997/07/21

試験ガイドライン No.471

細菌復帰突然変異試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (1997), Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-471-1997.pdf.

©OECD(1997)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at

http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

471

1997 年 7 月 21 日採択

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

細菌復帰突然変異試験

はじめに

1. 細菌復帰突然変異試験は、アミノ酸要求性のサルモネラ菌と大腸菌の株を用いて点変異を検出する。この点変異には、1 ないし 2、3 の DNA 塩基対の置換、付加または欠失が係る(1)(2)(3)。この細菌復帰突然変異試験の原則は、試験菌株の持つ突然変異が復帰して必須アミノ酸を合成する機能的な能力を回復した突然変異を検出することである。復帰細菌株は、親試験株が要求するアミノ酸非存在下で増殖する能力によって検出される。

2. 点変異は多くのヒト遺伝病の原因であり、ヒトおよび実験動物における腫瘍形成には、がん遺伝子や体細胞のがん抑制遺伝子の点変異が係っていることを示すかなりの証拠がある。細菌復帰突然変異試験は迅速で安価であり、かつ比較的容易に実施できる。試験菌株の多くは、変異の検出感度をより高めるいくつかの性質を備えている。すなわち、復帰サイトに応答性の DNA 配列をもっている、大きな分子に対する膜透過性が高い、DNA 修復機構が除去されている、あるいは DNA 修復過程で誤作動が多くなっているなどである。試験菌株の特異性によって、遺伝毒性の薬剤が誘発する突然変異のタイプに関していくつかの有用な情報が得られる。多種多様な構造の化学物質の細菌復帰突然変異試験結果に関する膨大なデータベースが入手可能であり、揮発性化合物を含む種々の物理化学的特性をもった化合物を試験するための方法論が開発され、十分に確立されている。

3. 用いた定義を補遺に提示する。

最初に考慮すべき事項

4. 細菌復帰突然変異試験では原核細胞を利用するが、それは物質の取り込み、代謝、染色体構造および DNA 修復過程などの因子に関して哺乳動物細胞とは異なる。*in vitro* で行われる試験では、一般に外因性由来の代謝活性を用いる必要がある。*in vitro* の代謝活性化系では、哺乳類の *in vivo* 状況を完全に再現することはできない。したがって、この試験では、哺乳類における物質の変異原性および発がん作用について直接的な情報が得られるわけではない。

5. 細菌復帰突然変異試験は遺伝毒性活性、特に点変異を誘発する活性を評価する最初のスクリーニングとして一般に使用される。大規模なデータベースによって、この試験で陽性を示した多くの化学物質が他の試験でも変異原性を示すことが分かっている。この試験では検出できない変異原の例もあるが、こうした欠点は測定する評価項目、代謝活性の違いまたはバイオアベイラビリティの違いなど、特異的な性質が原因であろう。一方、細菌復帰突然変異試験の感度を亢進する要因は、変異原性活性の過剰評価につながることになる。

6. 細菌復帰突然変異試験は、特定の種類の化学物質の評価には不適切な可能性がある。例えば、殺菌作用の強い物質（特定の抗生物質）および哺乳類細胞の複製系に特異的に干渉すると考えられている（または知られている）物質（ある種のトポイソメラーゼ阻害薬とヌクレオシド類縁体）である。そのような場合、哺乳類の突然変異試験がより適切であろう。

7. この試験で陽性の多くの化合物が哺乳類の発がん物質でもあるが、この相関は絶対的なものではない。それは化学物質の種類に依存しており、遺伝毒性機序および細菌には存在しない機序で作用する発がん物質は、この試験では検出されない。

試験の概要

8. 細菌細胞の懸濁液を、外因性の代謝活性化系存在下および非存在下で被験物質に暴露させる。プレート法では、懸濁液を軟寒天に混合して直ちに平板の最少培地上に重層した。プレインキュベーション法では処理混合液を培養してから軟寒天と混合し、平板の最少培地上に重層した。いずれの方法でも、培養 2、3 日後に復帰細胞コロニーを計数し、溶剤対照平板上の自然発生復帰細胞コロニー数と比較する。

9. いくつかの細菌復帰突然変異試験の実施手順が記述されている。その中で一般的に用いられるのは、プレート法(1)(2)(3)(4)、プレインキュベーション法(2)(3)(5)(6)(7)(8)、変動法(9)(10)および懸濁法(11)である。気体または蒸気を試験するための変更についても述べられている（12）。

10. このガイドラインで述べる手順は、主にプレート法とプレインキュベーション法である。代謝活性化系存在下および非存在下の実験に対して、どちらも許容できる。ある化合物は、プレインキュベーション法を用いる方がより効率的に検出される可能性がある。短鎖脂肪族ニトロソアミン、二価金属、アルデヒド、アゾ色素、ジアゾ化合物、ピロリジジンアルカロイド、アリル化合物およびニトロ化合物などの種類に属する化合物がこれに当たる(3)。特定の種類の変異原は、プレート法やプレインキュベーション法などの標準操作法では必ずしも検出できないことも認められている。これらは「特例」と考えるべきで、その検出のために別の方法を使うよう、強く推奨したい。以下の「特例」も、（その検出に使用できる手順の例と共に）特定されている：アゾ色素とジアゾ化合物(3)(5)(6)(13)、気体と揮発性化学物質(12)(14)(15)(16)）およびグリコシド(17)(18)。標準操作法から逸脱する場合には、科学的に正当化される必要がある。

試験方法

準備

細菌

11. 細菌を新たに培養し、指数増殖期後期から静止期早期まで増殖させる（約 10^9 細胞／mL）。静止期後期の細胞は使用すべきではない。実験に使用される培養は、増殖可能な細菌力価の高いものとする。力価は成長曲線に関する背景の対照データ、または測定ごとにプレート培養実験を実施して生存細胞数を決定することにより示すことが出来る。

12. 培養温度は、37°C が推奨される。

13. 少なくとも 5 つの細菌株を使用する。その中には、試験機関間で信頼性が高く再現性が示されているネズミチフス菌（TA1535、TA1537 または TA97a または TA97、TA98 および TA100）の 4 つの株を含むものとする。これらの 4 つのネズミチフス菌株は一次復帰部位に GC 塩基対を持っていること、そして特定の酸化変異誘発物質、架橋物質およびヒドラジンを検出し得ないことが知られている。そのような物質は、一次復帰部位に AT 塩基対を持つ大腸菌 WP2 株またはネズミチフス菌 TA102(19)によって検出される可能性がある。したがって、以下の株の組合せが推奨される。

1. ネズミチフス菌 TA1535、および
2. ネズミチフス菌 TA1537 または TA97 または TA97a、および
3. ネズミチフス菌 TA98、および
4. ネズミチフス菌 TA100、および
5. 大腸菌 WP2 uvrA、大腸菌 WP2 uvrA（pKM101）またはネズミチフス菌 TA102。

架橋変異誘発物質を検出するために TA102 を含むか、DNA 修復に優れた大腸菌[例えば、大腸菌 WP2 または大腸菌 WP2（pKM101）を加えることが望ましい。]

14. 保存培養の調製、標識確認および貯蔵には確立された方法を用いる。冷凍保存培養試料ごとに増殖のためのアミノ酸要求性、（ネズミチフス菌株についてはヒスチジン、大腸菌株についてはトリプトファン）を示す。他の表現型の特徴も同様に確認する。つまり、該当する場合には、R 因子プラスミドの有無、[すなわち TA98、TA100、および TA97a または TA97、WP2 uvrA および WP2 uvrA（pKM101）におけるアンピシリン抵抗性、および TA102 におけるアンピシリン＋テトラサイクリン抵抗性]、特徴的な突然変異の発現（すなわち、ネズミチフス菌のクリスタルバイオレット感受性 rfa 突然変異、大腸菌における紫外線感受性 uvrA 突然変異またはネズミチフス菌における紫外線感受性 uvrB 突然変異）(2)(3)の存在などである。これらの株では、試験機関の背景の対照データから予想される頻度、望ましくは文献で報告されている範囲の頻度で自然発生的な復帰細胞コロニーが得られなければならない。

培地

15. 数回の細胞分裂を起こさせるために、適当量の最小寒天培地（例えば、Vogel-Bonner の最少培地 E とグルコースを含む）とヒスチジンおよびビオチンまたはトリプトファンを含む軟寒天を用いる(1)(2)(9)。

代謝活性

16. 細菌を、適切な代謝活性化系存在下および非存在下の状態で被験物質に暴露させる。最も一般的に用いられる系は、Aroclor 1254 (1)(2)などの酵素誘導剤で処理したものか、またはフェノバルビトンとβ-ナフトフラボンを併用した(18)(20)(21)、げっ歯類の肝臓から得た補酵素を添加したミクロソーム画分（S9）である。ミクロソーム画分は、通常、S9-mix 中 5～30%（v/v）の濃度範囲で使用される。代謝活性化系の選択と条件は、試験された被験化学物質のクラスに依存する可能性がある。場合によっては、複数の濃度のミクロソーム画分を用いる方が良いかもしれない。アゾ色素とジアゾ化合物については、還元的代謝活性化系を使用するのがより適切であろう(6)(13)。

被験物質／準備

17. 固体の被験物質は細胞に添加する前に適切な溶媒／溶剤に、溶解／懸濁するか、必要に応じて希釈する。液体の被験物質は試験系に直接添加するか、添加前に希釈する。保存有効期間を示す安定性データがない限り、被験物質の新鮮な溶液を用いる。

試験条件

溶剤／溶媒

18. 溶剤／溶媒は、被験物質と化学反応を起こす疑いがないものを用い、細胞の生存と S9 活性がともに適合できるようにする(22)。性質が既知ではない溶剤／溶媒を用いるときは、適合性を示すデータが助けとなる。可能であれば、まず水溶性の溶剤／溶媒を用いることが推奨される。被験物質が水に不安定であれば、有機溶媒に水が混ざらないこと。

暴露濃度

19. 被験物質の最高用量を決定するとき、考慮に入れるべき基準として最終処理混合液中の細胞毒性と溶解性がある。予備実験で毒性と不溶性を測定するのは有用であろう。細胞毒性は復帰細胞コロニー数の減少、菌叢の消失または縮小、または処理された培養の生存率によって検出できる。物質の細胞毒性は、代謝活性化系の存在により変化する可能性がある。不溶性は実際の試験条件下における最終混合液中で、肉眼で明らかな沈殿として評価する。可溶性で細胞毒性を持たない物質の最大試験濃度として推奨されるのは、5 mg/プレートまたは 5 μL/プレートである。5 mg/プレートまたは 5 μL/プレートの濃度では溶解しない非細胞毒性物質については、最終処理混合液の濃度の一つ以上が不溶性でなければならない。5 mg/プレートまたは 5 μL/プレートより低濃度ですでに細胞毒性を示す被験物質については、細胞毒性が現れる濃度まで検査する。沈殿物は計数を妨害しないこと。

20. 被験物質の試験濃度については、最初の実験では約 3.2 倍（half log）間隔（√10）の少なくとも 5 つの異なる分析可能な濃度を使用する。濃度反応を調べる場合は、より狭い間隔が適切であろう。

21. 変異原性が疑われる不純物を相当量含んでいる物質を評価する場合は、5 mg/プレートまたは 5 μL/プレートより高濃度で評価することを考えてもよい。

対照

22. 株特異性の陽性対照および陰性対照（溶剤または溶媒）を、それぞれ代謝活性化系存在下および非存在下で、同時に測定する。各測定が有効に実施されたこと確認できるような陽性対照濃度を選択する。

23. 代謝活性化系存在下で測定する場合、使用する細菌株のタイプに基づいて陽性対照参照物質を選択する。以下の化学物質は、代謝活性化による測定のための適切な陽性対照の例である。

化学物質および CAS 番号
9,10-ジメチルアントラセン[CAS 番号 781-43-1]
7,12-ジメチルベンズアントラセン[CAS 番号 57-97-6]
コンゴレッド[CAS 番号 573-58-0]（還元的代謝活性法のため）
ベンゾピレン[CAS 番号 50-32-8]
シクロホスファミド（一水和物）[CAS 番号 50-18-0 (CAS 番号 6055-19-2)]
2-アミノアントラセン[CAS 番号 613-13-8]

2-アミノアントラセンが、S9-mix の有効性の唯一の指標として使用してはならない。2-アミノアントラセンを用いる場合、S9 のバッチごとに、ミクロソーム酵素による代謝活性化を要求する変異原、例えば、ベンゾピレンやジメチルベンズアントラセンを用いて評価する。

24. 代謝活性化系非存在下で測定する場合、株特異性の陽性対照の例を以下に示す。

化学物質および CAS 番号	菌株
(a) アジ化ナトリウム[CAS 番号 26628-22-8]	TA1535 および TA100
(b) 2-ニトロフルオレン[CAS 番号 607-57-8]	TA98
(c) 9-アミノアクリジン[CAS 番号 90-45-9]または ICR191 [CAS 番号 17070-45-0]	TA1537、TA97 および TA97a
(d) クメンヒドロペルオキシド[CAS 番号 80-15-9]	TA102
(e) マイトマイシン C[CAS 番号 50-07-7]	WP2 uvrA および TA102
(f) N-エチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン[CAS 番号 70-25-7]または 4-ニトロキノリン 1-オキシド[CAS 番号 56-57-5]	WP2、WP2 uvrA および WP2 uvrA (pKM101)
(g) フリルフラミド(AF-2)[CAS no. 3688-53-7]	プラスミド含有菌株

25. 他の適切な陽性対照物質を用いることもできる。入手可能な場合、化学物質の種類に関する陽性対照化学物質の使用を考慮してもよい。

26. 溶剤または溶媒のみからなる陰性対照を設定し、被験物質で処理しないこと以外は試験培地と同様に扱う。選択した溶剤が有害作用や変異原性作用を誘発しないことを示す背景データがない限りは、無添加の対照を用いる。

手順

被験物質の添加

27. 代謝活性化非存在下のプレート法では(1)(2)(3)(4)、通常、0.05 mL または 0.1 mL 試験液、0.1 mL の新鮮細菌培養（約 10^8 の生菌を含む）と 0.5 mL の無菌緩衝液を 2.0 mL の軟寒天と混合する。代謝活性化条件下の測定では、通常、細菌および被験物質／被験溶液とともに、十分量のミクロソーム画分（5～30% v/v 代謝活性化混合物）を含む 0.5 mL の代謝活性化混合物を軟寒天（2.0 mL）と混合する。各試験管の内容物を混合し、最小寒天プレートの表面上に注ぐ。軟寒天は培養前に凝固させる。

28. プレインキュベーション法では(2)(3)(5)(6)、被験物質／被験溶液は試験菌株（約 10^8 の生菌を含む）とともに無菌緩衝液または代謝活性化系（0.5 mL）中で通常 20 分以上 30～37°C でプレインキュベートし、その後軟寒天と混合し、最小寒天培地表面に注ぐ。通常、0.05 または 0.1 mL の被験物質／被験溶液、0.1mL の細菌および 0.5mL の S9-mix または無菌緩衝液を、2.0mL の軟寒天に混合する。プレインキュベーション中は、振とう機を用いて試験管を通気する。

29. 変動を十分に推定するために、各用量につき 3 連のプレートを用いる。科学的に正当な理由があるときは、2 連のプレートでもよい。プレートが偶然失われても、測定が必ずしも無効になるというわけではない。

30. 気体または揮発性物質は密封した培養容器などの適切な方法で試験する(12)(14)(15)(16)。

培養

31. 一つの試験におけるプレートは全て 48～72 時間、37°C で培養する。培養後、プレートあたりの復帰コロニー数を計測する。

データおよび報告

結果の処理

32. データはプレートあたりの復帰細胞コロニー数として示す。陰性対照（溶剤対照および使用した場合は無添加の対照）および陽性対照プレートの復帰コロニー数も示す。

33. 被験物質と陽性および陰性（無添加および／または溶剤）対照について、個々のプレート上の復帰コロニー数、平板あたりの復帰コロニーの平均個数および標準偏差を示す。

34. 明らかな陽性反応の検証は必要ではない。不確かな結果については更に試験を行ったうえで明確にすべきであるが、その際は実験条件を修正することが望ましい。陰性結果については、状況に応じて確認する必要がある。陰性結果の確認が必要でないと考えられる場合には、正当な理由を提出する。条件範囲を拡大する試験パラメータの修正は、追跡試験にて考慮する。修正する可能性のある試験パラメータには、濃度間隔、処理法（プレート法または液体プレインキュベーション法）および代謝活性化条件を含む。

結果の評価および解釈

35. 陽性結果であると決定する基準がいくつかある。例えば、プレートあたりの復帰コロニー数が検査された範囲で濃度依存性に増加した場合、および／または、代謝活性化系の有無とは無関係に、少なくとも 1 つの株において 1 つ以上の濃度で再現性を持って増加した場合である(23)。結果の生物学的関連をまず考慮する。統計解析は結果を評価する目的で用いる(24)。ただし、統計学的な有意差は陽性反応を決定付ける唯一の因子ではない。

36. 結果が上記の基準と合致しない被験物質は、本試験系では変異原性を有さないと考えられる。

37. 多くの実験で明らかな陽性または陰性結果を示していても、データセットから被験物質の活性を明確に判定できないことがまれにある。繰り返される実験回数に限らず、不確かな結果や疑問のある結果が解決されないことがある。

38. 細菌復帰突然変異試験の陽性結果は、物質がネズミチフス菌および／または大腸菌のゲノムにおいて塩基置換またはフレームシフトによって点変異を誘発したことを意味する。陰性結果は、試験条件下では試験に用いた菌株では被験物質が突然変異誘発性でなかったことを意味する。

試験報告書

39. 試験報告書は、以下の情報を含まなければならない。

被験物質
- 分かっている場合、特定データと CAS 番号
- 物理的性質と純度
- 試験の実施に関連する物理化学的特性
- 分かっている場合、被験物質の安定性

溶剤／溶媒
- 溶剤／溶媒の選択の妥当性
- 分かっている場合、溶剤／溶媒中の被験物質の溶解性と安定性

菌株
- 使用する菌株
- 培養あたりの細胞数
- 菌株の特徴

試験条件
- プレートあたりの被験物質の量（mg/プレートまたはμg/プレート）、用量の選択および濃度あたりのプレート数選択の根拠
- 使用する培地
- 許容基準を含む代謝活性化系の種類と組成
- 処理手順

結果
- 毒性の徴候
- 沈殿の痕跡
- 各プレート上の計測値
- プレートあたりの復帰コロニーの平均個数と標準偏差
- 可能な場合、用量反応関係
- もしあれば、統計解析
- 同時に実施した陰性（溶剤／溶媒）と陽性対照のデータ、範囲、平均および標準偏差
- 背景の陰性（溶剤／溶媒）と陽性対照データ、範囲、平均および標準偏差

結果の考察

結論

参考文献

(1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Res., 312, 217-233.

(4) Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The Salmonella Typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. Mutation Res., 168, 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives. Cancer Letters, 1, 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. pp. 273-285.

(7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1990). Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschbacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food Safety, 8, 167-177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, 33-42.

(10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D., and J.W. Bridges (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator , M., Nichols, W. and Ramel C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

(11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella typhimurium. Environmental Mutagenesis, 3, 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. Mutation Res., 307, 335-344.

(13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. Mutation Res., 136, 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B. E**.**, Haworth, S, Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 19, 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.)., Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. Environmental Mutagenesis, 9, 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in Salmonella typhimurium. Cancer Res., 39, 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames. B.N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990). Comparison of Salmonella typhimurium TA 102 with Escherichia coli WP2 Tester strains. Mutagenesis, 5, 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: "*In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing", Eds F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J., and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., 88, 343-350.

(23) Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E., and Zeiger, E., (1987). Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. Mutation Res., 189, 83-91.

(24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

補遺

定義

復帰突然変異試験は、サルモネラ菌と大腸菌のいずれにおいてもアミノ酸要求性株（それぞれヒスチジンまたはトリプトファン）の変異により、外からのアミノ酸供給には依存しない株の生成による突然変異を検出する。

塩基対置換型変異誘発物質とは、DNA の塩基変化を引き起こす物質である。復帰試験では、この変化は第一突然変異部位で起こる場合もあるし、細菌ゲノムの第二部位で起こる場合もある。

フレームシフト型突然変異原物質は、DNA で 1 つ以上の塩基対の付加または欠失を引き起こす物質で、それにより RNA で読み取り枠を変える。