



1,4-ジエチルベンゼン の  
細菌を用いる  
復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

## 【目 次】

|                 | 頁 |
|-----------------|---|
| 要 約 .....       | 1 |
| 緒 言 .....       | 2 |
| 材料および試験方法 ..... | 3 |
| 試験結果および考察 ..... | 6 |
| 参 考 文 献 .....   | 7 |
| Tables 1～4      |   |

## 【要 約】

1,4-ジエチルベンゼンの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然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、用量設定試験は直接法および代謝活性化法のいずれも、0.5～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で、本試験は直接法および代謝活性化法のいずれも 2.441～78.12  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で試験を実施した。

その結果、それぞれ2回実施した本試験において、用いた5種類の検定菌とも、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、1,4-ジエチルベンゼンは、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 】

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、1,4-ジエチルベンゼンについて、細菌を用いる復帰突然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<sup>(1)</sup>、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<sup>(2)</sup>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法と、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法とからなっている。

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。

## 【材料および試験方法】

### 〔検 定 菌〕

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

*S. typhimurium* の 4 菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、

から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年 5 月 9 日に

から分与を

受けた。

検定菌は、 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (OXOID, B-1674/1) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、10~12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〕

1,4-ジエチルベンゼン (CAS No. 105-05-5、以下DEBと略) は、分子量 134.22、比重 0.862 の無色透明の液体である。純度 97.0%のもの (ロット番号:

) を から供与された。被験物質は、使用時まで密栓して冷所に保管した。

DEBは、アセトン (ロット番号: DSR 3251、和光純薬工業(株)) を用いて 50 mg/ml となるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。なお、調製にあたって、純度および比重換算は行わなかった。

試験の開始に先立って、秦野研究所においてDEBのアセトン溶液中での安定性試験を行った。すなわち、本試験および染色体異常試験 (H-92-200) における最高濃度 (260 mg/ml) および最低濃度 (24.41  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 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4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 (0時間) の平均に対して、100および95.0%であった。これらの値は、当研究所の基準を満たしていた (Appendixes 1、2)。

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、781.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液の含量は既定濃度に対し、102~104%、また、24.41  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液は、99.9~

112%であった。これらの値も当研究所の基準を満たしていた (Appendix 3)。

以上の結果から、DEBはアセトン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。

#### [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))         | ロット番号 46,       | 純度99.9% |
| SA : アジ化ナトリウム      | (和光純薬工業(株))       | ロット番号 TWR3330,  | 純度>90%  |
| 9-AA : 9-アミノアクリジン  | (Sigma Chem. Co.) | ロット番号 96F05641, | 純度>98%  |
| 2-AA : 2-アミノアントラセン | (和光純薬工業(株))       | ロット番号 DSF2950,  | 純度>90%  |

AF-2, 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、用時解凍した。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解し速やかに試験に用いた。

#### [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) バクアガー (Difco) | 0.6% | (B) L-ヒスチジン | 0.5 mM |
| 塩化ナトリウム           | 0.5% | イオニン        | 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、日清製粉株式会社製の最少寒天培地 (用量設定試験においてはロット番号 : DJ030EH, 1992年5月14日製造、および DJ040IH, 1992年9月4日製造、本試験においては、ロット番号 : DJ040IH, 1992年9月4日製造) 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 | 0.2 g | リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物 | 3.5 g |
| クエン酸・1水和物     | 2 g   | グルコース                 | 20 g  |
| リン酸水素二カルシウム   | 10 g  | バクアガー (Difco)         | 15 g  |

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 ml 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  | NADH        | 4 μmol |
| 塩化マグネシウム   | 8 μmol  | NADPH       | 4 μmol |
| 塩化カリウム     | 33 μmol | 0.2M リン酸緩衝液 |        |
| グルコース・6リン酸 | 5 μmol  | (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 (キッコーマン株、ロット番号 RAA-280、1992年7月24日製造、RAA-284、1992年10月30日製造)を用いた。PBおよびBFの投与量は1日目 PB 30 mg/kg、2日目 PB 60mg/kg、3日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したものである。

[試験方法]

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトッパアガー 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して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりにアセトン、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°Cで48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面上の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は抗菌性を認めたことから2回、本試験は同一用量について2回実施し、再現性の確認を行った。

[判定基準]

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、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。

## 【試験結果および考察】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

### 〔用量設定試験〕

結果を Tables 1、2 に示した。DEBについて、0.5～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で試験を実施したところ、直接法では、50  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で抗菌性を認めた。一方、代謝活性化法では、1回目の用量設定試験においてすべての検定菌で、50  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で抗菌性が認められたが、2回目の用量設定試験では最高 50  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で抗菌性は認められなかった。

そこで、本試験における最高用量は、直接法、代謝活性化法とも抗菌性の認められる用量範囲の 78.12  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とし、6用量を設定することとした。

### 〔本試験〕

結果を Tables 3、4 に示した。DEBについて上記の用量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法、代謝活性化法のいずれにおいても、用量依存性のある陰性対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。抗菌性は、2回の直接法、代謝活性化法による本試験において、いずれも最高用量の 78.12  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  あるいは 39.06  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で認められた。

DEBについて実施した試験において、陽性対照群では、いずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、陰性対照群とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、DEB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。



【参 考 文 献】

- (1) Maron, D.M. and Ames, B.N. : Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M.H.L. : in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. (1984) pp. 161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with 1,4-Diethylbenzene

| With (+) or without (-)<br>S9 Mix | Test substance<br>dose<br>( $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) | Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.) |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                      |      |      |  |
|-----------------------------------|--|--|-----|-----|--------------------|-----|-----|--------------------|-----|-----|--------------------|-----|-----|----------------------|------|------|--|
|                                   |  | Base - pair substitution type                                      |     |     |                    |     |     |                    |     |     | Frameshift type    |     |     |                      |      |      |  |
|                                   |  | TA100  |     |     | TA1535             |     |     | WP2uvrA            |     |     | TA98               |     |     | TA1537               |      |      |  |
| S9Mix<br>(-)                      | 0  | 103  | 104 | 115 | 13                 | 8   | 12  | 26                 | 14  | 13  | 29                 | 26  | 29  | 8                    | 9    | 8    |  |
|                                   |  | ( 107 $\pm$ 6.7 )  |     |     | ( 11 $\pm$ 2.6 )   |     |     | ( 18 $\pm$ 7.2 )   |     |     | ( 28 $\pm$ 1.7 )   |     |     | ( 8 $\pm$ 0.6 )      |      |      |  |
|                                   | 50   | 61 *   |     |     | 4 *                |     |     | 15 *               |     |     | 20 *               |     |     | 0 *                  |      |      |  |
|                                   | 150  | 4 *  |     |     | 6 *                |     |     | 14 *               |     |     | 18 *               |     |     | 0 *                  |      |      |  |
|                                   | 500  | 13 *   |     |     | 2 *                |     |     | 5 *                |     |     | 0 *                |     |     | 0 *                  |      |      |  |
|                                   | 1500   | 0 *  |     |     | 2 *                |     |     | 3 *                |     |     | 0 *                |     |     | 0 *                  |      |      |  |
|                                   | 5000   | 0 *  |     |     | 0 *                |     |     | 7 *                |     |     | 0 *                |     |     | 0 *                  |      |      |  |
|                                   |  |  |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                      |      |      |  |
| S9Mix<br>(+)                      | 0  | 116  | 107 | 94  | 16                 | 16  | 12  | 17                 | 16  | 13  | 34                 | 35  | 25  | 9                    | 10   | 10   |  |
|                                   |  | ( 106 $\pm$ 11.1 )   |     |     | ( 15 $\pm$ 2.3 )   |     |     | ( 15 $\pm$ 2.1 )   |     |     | ( 31 $\pm$ 5.5 )   |     |     | ( 10 $\pm$ 0.6 )     |      |      |  |
|                                   | 50   | 78 *   |     |     | 8 *                |     |     | 7 *                |     |     | 31 *               |     |     | 3 *                  |      |      |  |
|                                   | 150  | 60 *   |     |     | 7 *                |     |     | 5 *                |     |     | 19 *               |     |     | 7 *                  |      |      |  |
|                                   | 500  | 49 *   |     |     | 6 *                |     |     | 5 *                |     |     | 21 *               |     |     | 1 *                  |      |      |  |
|                                   | 1500   | 32 *   |     |     | 0 *                |     |     | 6 *                |     |     | 27 *               |     |     | 0 *                  |      |      |  |
|                                   | 5000   | 7 *  |     |     | 0 *                |     |     | 4 *                |     |     | 10 *               |     |     | 0 *                  |      |      |  |
|                                   |  |  |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                      |      |      |  |
| Positive control<br>S9 Mix (-)    | Chemical   | AF2  |     |     | SA                 |     |     | AF2                |     |     | AF2                |     |     | 9AA                  |      |      |  |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )                      | 0.01   |     |     | 0.5                |     |     | 0.01               |     |     | 0.1                |     |     | 80                   |      |      |  |
| Positive control<br>S9 Mix (+)    | Chemical   | 2AA  |     |     | 2AA                |     |     | 2AA                |     |     | 2AA                |     |     | 2AA                  |      |      |  |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )                      | 1  |     |     | 2                  |     |     | 10                 |     |     | 0.5                |     |     | 2                    |      |      |  |
| S9 Mix (+)                        | Number of colonies / plate                               | 492  | 438 | 468 | 211                | 214 | 221 | 186                | 156 | 186 | 628                | 528 | 582 | 2857                 | 2973 | 2586 |  |
|                                   |  | ( 466 $\pm$ 27.1 )   |     |     | ( 215 $\pm$ 5.1 )  |     |     | ( 176 $\pm$ 17.3 ) |     |     | ( 579 $\pm$ 50.1 ) |     |     | ( 2805 $\pm$ 198.6 ) |      |      |  |
| S9 Mix (+)                        | Number of colonies / plate                               | 549  | 562 | 555 | 198                | 159 | 194 | 320                | 368 | 280 | 208                | 138 | 208 | 210                  | 186  | 181  |  |
|                                   |  | ( 555 $\pm$ 6.5 )  |     |     | ( 184 $\pm$ 21.5 ) |     |     | ( 323 $\pm$ 44.1 ) |     |     | ( 185 $\pm$ 40.4 ) |     |     | ( 192 $\pm$ 15.5 )   |      |      |  |

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

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 2. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with 1,4-Diethylbenzene

| With (+) or without (-)<br>S9 Mix | Test substance<br>dose<br>( $\mu\text{g}$ /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate , Mean $\pm$ S.D.) |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                     |      |      |  |
|-----------------------------------|---|---|-----|-----|--------------------|-----|-----|--------------------|-----|-----|--------------------|-----|-----|---------------------|------|------|--|
|                                   |   | Base - pair substitution type                                       |     |     |                    |     |     |                    |     |     | Frameshift type    |     |     |                     |      |      |  |
|                                   |   | TA100   |     |     | TA1535             |     |     | WP2uvrA            |     |     | TA98               |     |     | TA1537              |      |      |  |
| S9 Mix<br>(-)                     | 0   | 145   | 137 | 118 | 22                 | 11  | 13  | 28                 | 30  | 15  | 17                 | 20  | 27  | 7                   | 6    | 8    |  |
|                                   |   | ( 133 $\pm$ 13.9 )  |     |     | ( 15 $\pm$ 5.9 )   |     |     | ( 24 $\pm$ 8.1 )   |     |     | ( 21 $\pm$ 5.1 )   |     |     | ( 7 $\pm$ 1.0 )     |      |      |  |
|                                   | 0.5   | 100   |     |     | 14                 |     |     | 22                 |     |     | 17                 |     |     | 8                   |      |      |  |
|                                   | 1.5   | 99  |     |     | 12                 |     |     | 22                 |     |     | 18                 |     |     | 5                   |      |      |  |
|                                   | 5   | 92  |     |     | 17                 |     |     | 32                 |     |     | 17                 |     |     | 8                   |      |      |  |
|                                   | 15  | 110   |     |     | 16                 |     |     | 11                 |     |     | 15                 |     |     | 4                   |      |      |  |
|                                   | 50  | 57 *  |     |     | 13 *               |     |     | 15 *               |     |     | 15 *               |     |     | 3 *                 |      |      |  |
|                                   |   |   |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                     |      |      |  |
| S9 Mix<br>(+)                     | 0   | 123   | 157 | 121 | 17                 | 11  | 10  | 24                 | 17  | 24  | 19                 | 21  | 26  | 10                  | 12   | 12   |  |
|                                   |   | ( 134 $\pm$ 20.2 )  |     |     | ( 13 $\pm$ 3.8 )   |     |     | ( 22 $\pm$ 4.0 )   |     |     | ( 22 $\pm$ 3.6 )   |     |     | ( 11 $\pm$ 1.2 )    |      |      |  |
|                                   | 0.5   | 119   |     |     | 11                 |     |     | 17                 |     |     | 24                 |     |     | 12                  |      |      |  |
|                                   | 1.5   | 117   |     |     | 10                 |     |     | 19                 |     |     | 22                 |     |     | 13                  |      |      |  |
|                                   | 5   | 118   |     |     | 10                 |     |     | 20                 |     |     | 28                 |     |     | 8                   |      |      |  |
|                                   | 15  | 117   |     |     | 16                 |     |     | 16                 |     |     | 34                 |     |     | 12                  |      |      |  |
|                                   | 50  | 107   |     |     | 9                  |     |     | 18                 |     |     | 28                 |     |     | 6                   |      |      |  |
|                                   |   |   |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                    |     |     |                     |      |      |  |
| Positive control<br>S9 Mix (-)    | Chemical  | AF2   |     |     | SA                 |     |     | AF2                |     |     | AF2                |     |     | 9AA                 |      |      |  |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)                      | 0.01  |     |     | 0.5                |     |     | 0.01               |     |     | 0.1                |     |     | 80                  |      |      |  |
| Positive control<br>S9 Mix (+)    | Chemical  | 2AA   |     |     | 2AA                |     |     | 2AA                |     |     | 2AA                |     |     | 2AA                 |      |      |  |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)                      | 1   |     |     | 2                  |     |     | 10                 |     |     | 0.5                |     |     | 2                   |      |      |  |
| S9 Mix (+)                        | Number of colonies / plate                        | 585   | 615 | 586 | 269                | 244 | 267 | 125                | 130 | 138 | 724                | 702 | 674 | 3390                | 3420 | 3453 |  |
|                                   |   | ( 595 $\pm$ 17.0 )  |     |     | ( 260 $\pm$ 13.9 ) |     |     | ( 131 $\pm$ 6.6 )  |     |     | ( 700 $\pm$ 25.1 ) |     |     | ( 3421 $\pm$ 31.5 ) |      |      |  |
| S9 Mix (+)                        | Number of colonies / plate                        | 983   | 983 | 973 | 281                | 266 | 245 | 267                | 393 | 373 | 429                | 371 | 386 | 251                 | 238  | 182  |  |
|                                   |   | ( 980 $\pm$ 5.8 )   |     |     | ( 264 $\pm$ 18.1 ) |     |     | ( 344 $\pm$ 67.7 ) |     |     | ( 395 $\pm$ 30.1 ) |     |     | ( 224 $\pm$ 36.7 )  |      |      |  |

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

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 1,4-Diethylbenzene

| With (+) or without (-)<br>S9 Mix | Test substance<br>dose<br>( $\mu\text{g}$ /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.) |       |                  |                    |      |                  |                    |      |                  |                    |                  |                      |      |      |      |  |
|-----------------------------------|---|--|-------|------------------|--------------------|------|------------------|--------------------|------|------------------|--------------------|------------------|----------------------|------|------|------|--|
|                                   |   | Base - pair substitution type                                      |       |                  |                    |      |                  |                    |      |                  | Frameshift type    |                  |                      |      |      |      |  |
|                                   |   | TA100  |       |                  | TA1535             |      |                  | WP2uvrA            |      |                  | TA98               |                  | TA1537               |      |      |      |  |
| S9Mix<br>(-)                      | 0   | 117  | 123   | 115              | 16                 | 18   | 24               | 11                 | 14   | 12               | 22                 | 25               | 17                   | 6    | 5    | 6    |  |
|                                   |   | ( 118 $\pm$ 4.2 )  |       |                  | ( 19 $\pm$ 4.2 )   |      |                  | ( 12 $\pm$ 1.5 )   |      |                  | ( 21 $\pm$ 4.0 )   |                  | ( 6 $\pm$ 0.6 )      |      |      |      |  |
|                                   | 2.441   | 89   | 116   | 107              | 20                 | 20   | 18               | 19                 | 17   | 16               | 24                 | 15               | 19                   | 9    | 5    | 4    |  |
|                                   |   | ( 104 $\pm$ 13.7 )   |       |                  | ( 19 $\pm$ 1.2 )   |      |                  | ( 17 $\pm$ 1.5 )   |      |                  | ( 19 $\pm$ 4.5 )   |                  | ( 6 $\pm$ 2.6 )      |      |      |      |  |
|                                   | 4.882   | 102  | 103   | 89               | 18                 | 23   | 18               | 24                 | 15   | 27               | 26                 | 23               | 19                   | 6    | 8    | 8    |  |
|                                   |   | ( 98 $\pm$ 7.8 )   |       |                  | ( 20 $\pm$ 2.9 )   |      |                  | ( 22 $\pm$ 6.2 )   |      |                  | ( 23 $\pm$ 3.5 )   |                  | ( 7 $\pm$ 1.2 )      |      |      |      |  |
|                                   | 9.765   | 127  | 134   | 121              | 16                 | 12   | 18               | 14                 | 14   | 14               | 22                 | 19               | 16                   | 2    | 7    | 7    |  |
|                                   |   | ( 127 $\pm$ 6.5 )  |       |                  | ( 15 $\pm$ 3.1 )   |      |                  | ( 14 $\pm$ 0.0 )   |      |                  | ( 19 $\pm$ 3.0 )   |                  | ( 5 $\pm$ 2.9 )      |      |      |      |  |
| 19.53                             | 101   | 88   | 92    | 10               | 15                 | 11   | 21               | 14                 | 21   | 14               | 22                 | 11               | 9                    | 8    | 2    |      |  |
|                                   | ( 94 $\pm$ 6.7 )                                  |  |       | ( 12 $\pm$ 2.6 ) |                    |      | ( 19 $\pm$ 4.0 ) |                    |      | ( 16 $\pm$ 5.7 ) |                    | ( 6 $\pm$ 3.8 )  |                      |      |      |      |  |
| 39.06                             | 27 *  | 78 *   | 69 *  | 5 *              | 9 *                | 10 * | 12 *             | 18 *               | 15 * | 10 *             | 11 *               | 13 *             | 4 *                  | 6 *  | 4 *  |      |  |
|                                   | ( 58 $\pm$ 27.2 )                                 |  |       | ( 8 $\pm$ 2.6 )  |                    |      | ( 15 $\pm$ 3.0 ) |                    |      | ( 11 $\pm$ 1.5 ) |                    | ( 5 $\pm$ 1.2 )  |                      |      |      |      |  |
| 78.12                             | 59 *  | 99 *   | 60 *  | 1 *              | 2 *                | 11 * | 3 *              | 0 *                | 7 *  | 15 *             | 18 *               | 17 *             | 0 *                  | 0 *  | 0 *  |      |  |
|                                   | ( 73 $\pm$ 22.8 )                                 |  |       | ( 5 $\pm$ 5.5 )  |                    |      | ( 3 $\pm$ 3.5 )  |                    |      | ( 17 $\pm$ 1.5 ) |                    | ( 0 $\pm$ 0.0 )  |                      |      |      |      |  |
|                                   |   |  |       |                  |                    |      |                  |                    |      |                  |                    |                  |                      |      |      |      |  |
|                                   |   |  |       |                  |                    |      |                  |                    |      |                  |                    |                  |                      |      |      |      |  |
| S9Mix<br>(+)                      | 0   | 123  | 113   | 125              | 17                 | 12   | 18               | 12                 | 18   | 12               | 28                 | 21               | 29                   | 13   | 13   | 17   |  |
|                                   |   | ( 120 $\pm$ 6.4 )  |       |                  | ( 16 $\pm$ 3.2 )   |      |                  | ( 14 $\pm$ 3.5 )   |      |                  | ( 26 $\pm$ 4.4 )   |                  | ( 14 $\pm$ 2.3 )     |      |      |      |  |
|                                   | 2.441   | 90   | 98    | 105              | 13                 | 15   | 23               | 21                 | 14   | 13               | 26                 | 26               | 16                   | 23   | 16   | 14   |  |
|                                   |   | ( 98 $\pm$ 7.5 )   |       |                  | ( 17 $\pm$ 5.3 )   |      |                  | ( 16 $\pm$ 4.4 )   |      |                  | ( 23 $\pm$ 5.8 )   |                  | ( 18 $\pm$ 4.7 )     |      |      |      |  |
|                                   | 4.882   | 116  | 104   | 99               | 22                 | 17   | 13               | 18                 | 12   | 14               | 27                 | 26               | 31                   | 12   | 15   | 10   |  |
|                                   |   | ( 106 $\pm$ 8.7 )  |       |                  | ( 17 $\pm$ 4.5 )   |      |                  | ( 15 $\pm$ 3.1 )   |      |                  | ( 28 $\pm$ 2.6 )   |                  | ( 12 $\pm$ 2.5 )     |      |      |      |  |
|                                   | 9.765   | 109  | 119   | 100              | 17                 | 17   | 12               | 14                 | 17   | 16               | 42                 | 41               | 36                   | 23   | 21   | 19   |  |
|                                   |   | ( 109 $\pm$ 9.5 )  |       |                  | ( 15 $\pm$ 2.9 )   |      |                  | ( 16 $\pm$ 1.5 )   |      |                  | ( 40 $\pm$ 3.2 )   |                  | ( 21 $\pm$ 2.0 )     |      |      |      |  |
| 19.53                             | 100   | 97   | 124   | 19               | 14                 | 5    | 22               | 24                 | 19   | 41               | 45                 | 37               | 25                   | 21   | 25   |      |  |
|                                   | ( 107 $\pm$ 14.8 )                                |  |       | ( 13 $\pm$ 7.1 ) |                    |      | ( 22 $\pm$ 2.5 ) |                    |      | ( 41 $\pm$ 4.0 ) |                    | ( 24 $\pm$ 2.3 ) |                      |      |      |      |  |
| 39.06                             | 113   | 106  | 119   | 16               | 14                 | 11   | 9 *              | 9 *                | 6 *  | 35 *             | 27 *               | 40 *             | 3 *                  | 9 *  | 10 * |      |  |
|                                   | ( 113 $\pm$ 6.5 )                                 |  |       | ( 14 $\pm$ 2.5 ) |                    |      | ( 8 $\pm$ 1.7 )  |                    |      | ( 34 $\pm$ 6.6 ) |                    | ( 7 $\pm$ 3.8 )  |                      |      |      |      |  |
| 78.12                             | 120 *   | 102 *  | 106 * | 8 *              | 11 *               | 14 * | 3 *              | 5 *                | 8 *  | 27 *             | 27 *               | 26 *             | 9 *                  | 0 *  | 4 *  |      |  |
|                                   | ( 109 $\pm$ 9.5 )                                 |  |       | ( 11 $\pm$ 3.0 ) |                    |      | ( 5 $\pm$ 2.5 )  |                    |      | ( 27 $\pm$ 0.6 ) |                    | ( 4 $\pm$ 4.5 )  |                      |      |      |      |  |
|                                   |   |  |       |                  |                    |      |                  |                    |      |                  |                    |                  |                      |      |      |      |  |
|                                   |   |  |       |                  |                    |      |                  |                    |      |                  |                    |                  |                      |      |      |      |  |
| Positive control                  | Chemical  | AF2  |       |                  | SA                 |      |                  | AF2                |      |                  | AF2                |                  | 9AA                  |      |      |      |  |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)                      | 0.01   |       |                  | 0.5                |      |                  | 0.01               |      |                  | 0.1                |                  | 80                   |      |      |      |  |
| S9 Mix (-)                        | Number of colonies / plate                        | 609  | 641   | 675              | 264                | 260  | 279              | 124                | 115  | 130              | 227                | 254              | 205                  | 2561 | 2298 | 2525 |  |
|                                   |   | ( 642 $\pm$ 33.0 )   |       |                  | ( 268 $\pm$ 10.0 ) |      |                  | ( 123 $\pm$ 7.5 )  |      |                  | ( 229 $\pm$ 24.5 ) |                  | ( 2461 $\pm$ 142.6 ) |      |      |      |  |
| Positive control                  | Chemical  | 2AA  |       |                  | 2AA                |      |                  | 2AA                |      |                  | 2AA                |                  | 2AA                  |      |      |      |  |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)                      | 1  |       |                  | 2                  |      |                  | 10                 |      |                  | 0.5                |                  | 2                    |      |      |      |  |
| S9 Mix (+)                        | Number of colonies / plate                        | 694  | 648   | 666              | 215                | 187  | 173              | 536                | 615  | 645              | 162                | 129              | 114                  | 247  | 205  | 227  |  |
|                                   |   | ( 669 $\pm$ 23.2 )   |       |                  | ( 192 $\pm$ 21.4 ) |      |                  | ( 599 $\pm$ 56.3 ) |      |                  | ( 135 $\pm$ 24.6 ) |                  | ( 226 $\pm$ 21.0 )   |      |      |      |  |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide. SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 4. Results of bacterial reverse mutation assay ( II )with 1,4-Diethylbenzene

| With (+) or without (-)     | Test substance dose (µg /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.) |      |      |                |      |      |                |      |      |                 |      |      |                  |      |      |
|-----------------------------|---------------------------------|---|------|------|----------------|------|------|----------------|------|------|-----------------|------|------|------------------|------|------|
|                             |                                 | Base - pair substitution type                                   |      |      |                |      |      |                |      |      | Frameshift type |      |      |                  |      |      |
|                             |                                 | TA100   |      |      | TA1535         |      |      | WP2uvrA        |      |      | TA98            |      |      | TA1537           |      |      |
| S9 Mix (-)                  | 0                               | 146   | 142  | 138  | 19             | 16   | 14   | 19             | 21   | 21   | 12              | 25   | 18   | 9                | 10   | 7    |
|                             |                                 | ( 142 ± 4.0 )   |      |      | ( 16 ± 2.5 )   |      |      | ( 20 ± 1.2 )   |      |      | ( 18 ± 6.5 )    |      |      | ( 9 ± 1.5 )      |      |      |
|                             | 2.441                           | 135   | 135  | 158  | 8              | 13   | 8    | 19             | 14   | 12   | 18              | 18   | 19   | 7                | 8    | 5    |
|                             |                                 | ( 143 ± 13.3 )  |      |      | ( 10 ± 2.9 )   |      |      | ( 15 ± 3.6 )   |      |      | ( 18 ± 0.6 )    |      |      | ( 7 ± 1.5 )      |      |      |
|                             | 4.882                           | 130   | 125  | 133  | 15             | 11   | 12   | 20             | 16   | 25   | 18              | 20   | 16   | 5                | 3    | 11   |
|                             |                                 | ( 129 ± 4.0 )   |      |      | ( 13 ± 2.1 )   |      |      | ( 20 ± 4.5 )   |      |      | ( 18 ± 2.0 )    |      |      | ( 6 ± 4.2 )      |      |      |
|                             | 9.765                           | 118   | 127  | 102  | 9              | 16   | 11   | 23             | 16   | 15   | 14              | 9    | 16   | 5                | 3    | 4    |
|                             |                                 | ( 116 ± 12.7 )  |      |      | ( 12 ± 3.6 )   |      |      | ( 18 ± 4.4 )   |      |      | ( 13 ± 3.6 )    |      |      | ( 4 ± 1.0 )      |      |      |
| S9 Mix (+)                  | 19.53                           | 101   | 90   | 98   | 9              | 7    | 11   | 14             | 11   | 24   | 19              | 14   | 18   | 5                | 5    | 6    |
|                             |                                 | ( 96 ± 5.7 )  |      |      | ( 9 ± 2.0 )    |      |      | ( 16 ± 6.8 )   |      |      | ( 17 ± 2.6 )    |      |      | ( 5 ± 0.6 )      |      |      |
|                             | 39.06                           | 5 *   | 8 *  | 36 * | 4 *            | 6 *  | 0 *  | 0 *            | 15 * | 5 *  | 10 *            | 9 *  | 6 *  | 2 *              | 9 *  | 6 *  |
|                             |                                 | ( 16 ± 17.1 )   |      |      | ( 3 ± 3.1 )    |      |      | ( 7 ± 7.6 )    |      |      | ( 8 ± 2.1 )     |      |      | ( 6 ± 3.5 )      |      |      |
|                             | 78.12                           | 0 *   | 0 *  | 0 *  | 0 *            | 0 *  | 0 *  | 0 *            | 0 *  | 0 *  | 0 *             | 5 *  | 11 * | 7 *              | 3 *  | 7 *  |
|                             |                                 | ( 0 ± 0.0 )   |      |      | ( 0 ± 0.0 )    |      |      | ( 0 ± 0.0 )    |      |      | ( 5 ± 5.5 )     |      |      | ( 6 ± 2.3 )      |      |      |
| Mix (+)                     | 0                               | 158   | 157  | 163  | 16             | 14   | 16   | 22             | 19   | 16   | 32              | 31   | 24   | 19               | 14   | 16   |
|                             |                                 | ( 159 ± 3.2 )   |      |      | ( 15 ± 1.2 )   |      |      | ( 19 ± 3.0 )   |      |      | ( 29 ± 4.4 )    |      |      | ( 16 ± 2.5 )     |      |      |
|                             | 2.441                           | 121   | 119  | 119  | 9              | 11   | 9    | 8              | 19   | 11   | 20              | 19   | 20   | 6                | 6    | 7    |
|                             |                                 | ( 120 ± 1.2 )   |      |      | ( 10 ± 1.2 )   |      |      | ( 13 ± 5.7 )   |      |      | ( 20 ± 0.6 )    |      |      | ( 6 ± 0.6 )      |      |      |
|                             | 4.882                           | 117   | 116  | 109  | 16             | 12   | 13   | 18             | 28   | 34   | 27              | 21   | 24   | 12               | 6    | 4    |
|                             |                                 | ( 114 ± 4.4 )   |      |      | ( 14 ± 2.1 )   |      |      | ( 27 ± 8.1 )   |      |      | ( 24 ± 3.0 )    |      |      | ( 7 ± 4.2 )      |      |      |
|                             | 9.765                           | 99  | 110  | 105  | 14             | 12   | 18   | 20             | 23   | 16   | 29              | 26   | 19   | 4                | 5    | 8    |
|                             |                                 | ( 105 ± 5.5 )   |      |      | ( 15 ± 3.1 )   |      |      | ( 20 ± 3.5 )   |      |      | ( 25 ± 5.1 )    |      |      | ( 6 ± 2.1 )      |      |      |
| S9 Mix (+)                  | 19.53                           | 102   | 116  | 112  | 14             | 13   | 11   | 32             | 27   | 24   | 27              | 24   | 28   | 5                | 6    | 12   |
|                             |                                 | ( 110 ± 7.2 )   |      |      | ( 13 ± 1.5 )   |      |      | ( 28 ± 4.0 )   |      |      | ( 26 ± 2.1 )    |      |      | ( 8 ± 3.8 )      |      |      |
|                             | 39.06                           | 108   | 96   | 94   | 10             | 11   | 15   | 19             | 17   | 21   | 18              | 33   | 27   | 6                | 8    | 5    |
|                             |                                 | ( 99 ± 7.6 )  |      |      | ( 12 ± 2.6 )   |      |      | ( 19 ± 2.0 )   |      |      | ( 26 ± 7.5 )    |      |      | ( 6 ± 1.5 )      |      |      |
|                             | 78.12                           | 91 *  | 98 * | 93 * | 13 *           | 11 * | 10 * | 12 *           | 16 * | 14 * | 12 *            | 19 * | 17 * | 7 *              | 7 *  | 7 *  |
|                             |                                 | ( 94 ± 3.6 )  |      |      | ( 11 ± 1.5 )   |      |      | ( 14 ± 2.0 )   |      |      | ( 16 ± 3.6 )    |      |      | ( 7 ± 0.0 )      |      |      |
| Positive control S9 Mix (-) | Chemical                        | AF2   |      |      | SA             |      |      | AF2            |      |      | AF2             |      |      | 9AA              |      |      |
|                             | Dose (µg /plate)                | 0.01  |      |      | 0.5            |      |      | 0.01           |      |      | 0.1             |      |      | 80               |      |      |
| Positive control S9 Mix (+) | Chemical                        | 2AA   |      |      | 2AA            |      |      | 2AA            |      |      | 2AA             |      |      | 2AA              |      |      |
|                             | Dose (µg /plate)                | 1   |      |      | 2              |      |      | 10             |      |      | 0.5             |      |      | 2                |      |      |
| S9 Mix (+)                  | Number of colonies / plate      | 711   | 655  | 704  | 291            | 265  | 314  | 149            | 152  | 114  | 710             | 692  | 732  | 2980             | 2544 | 2129 |
|                             |                                 | ( 690 ± 30.5 )  |      |      | ( 290 ± 24.5 ) |      |      | ( 138 ± 21.1 ) |      |      | ( 711 ± 20.0 )  |      |      | ( 2551 ± 425.5 ) |      |      |
| S9 Mix (+)                  | Number of colonies / plate      | 645   | 840  | 869  | 291            | 253  | 255  | 404            | 355  | 446  | 336             | 370  | 380  | 291              | 312  | 301  |
|                             |                                 | ( 785 ± 121.8 )   |      |      | ( 266 ± 21.4 ) |      |      | ( 402 ± 45.5 ) |      |      | ( 362 ± 23.1 )  |      |      | ( 301 ± 10.5 )   |      |      |

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

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.