



アクリル酸2-(ジメチルアミノ)エチルエステル
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
材料および方法	3
結果および考察	7
結 論	8
特 記 事 項	8
文 献	9
Tables 1~4	

【要 約】

アクリル酸2-(ジメチルアミノ) エチルエステルの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、陽性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験、2回の本試験および再現性試験を行った。用量設定試験を 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、S9 mix 無添加試験では、TA98 と TA1537 において 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、その他の検定菌においては 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では、WP2 *uvrA* 以外の検定菌において 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められた。したがって、本試験は S9 mix 無添加試験および添加試験ともに、最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA98 と TA1537 の S9 mix 無添加試験は 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) として、公比2で5~6用量を設定して実施した。また、TA98 の S9 mix 添加試験では、本試験Ⅱの最高用量の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ でのみ、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたため、再現性と用量依存性を確認するために、最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公差 800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で6用量を設定して再現性試験を実施した。

その結果、TA98 の S9 mix 添加試験において、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加が認められ、用量依存性もみられたことから、アクリル酸2-(ジメチルアミノ) エチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有する(陽性)と判定された。

【緒 言】

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、アクリル酸2-(ジメチルアミノ)エチルエステルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾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突然変異²⁾、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突然変異^{3, 4)}を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素(S9 mix)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S9 mix添加試験と、被験物質をそのまま検定菌に作用させるS9 mix無添加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毒性試験ガイドライン:471、472」に準拠し、「化学物質GLP基準」(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
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℃以下で凍結保存したものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異 (*rfa*) とアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で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〕

アクリル酸2-(ジメチルアミノ) エチルエステル (略称: DMAEA、CAS No. 2439-35-2) は、分子量 143.19 の無色-黄色透明液体 (受領時: 無色透明液体) である。構造式等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99.9 wt% [不純物: 0.01% 2-ジメチルアミノエタノール、0.01% アクリル酸、2000 ppm メトキノン (重合防止剤)] であり、 から供与された。被験物質は、使用時まで冷蔵した。なお、試験終了後に において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 99.8 wt% であった。

DMAEA は、局方注射用水 (ロット番号: K5A80、(株)大塚製薬工場) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約 3 ないし 2 で希釈し、速やかに試験に用いた。

〔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。

AF2	: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (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%以上)
9AA	: 9-アミナクリジン (Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641,	純度98%以上)
2AA	: 2-アミリアントラセン (和光純薬工業(株))	ロット番号 DSF2950,	純度90%以上)

AF2 および 2AA はジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業(株)) に溶解したものを -20℃ で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 mix 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) バクテリア (Difco)	0.6%	(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	D-ビオチン	0.5 mM

* : WP2 *uvrA* 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、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地 (ロット番号 : HY0302、1995年9月29日製造および HY0603、同年12月15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	水酸化ナトリウム	0.66 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	バクテリア (Difco)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 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 mix (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
塩化カルシウム	33 μmol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol		

** : 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-333、1995年9月8日製造および RAA-338、同年12月15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 60 mg/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、ラットの解剖および S9 の調製は5日目であった。

[試験方法]

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合し、37°Cで20分間往復振とう培養したのち、トップアガー 2 mlを加えて混和し、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使用溶媒、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各Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。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、溶媒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、本試験および再現性試験においては、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1回、本試験は同一用量について2回実施し、結果の再現性の確認を行った。また、TA98 の S9 mix 添加試験については、本試験 I と本試験 II の結果が異なるため、再現性試験を行った。また、陽性結果が得られた TA98 の S9 mix 添加試験については、本試験および再現性試験で変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上となった用量について、変異コロニー数の平均値から溶媒対照値を差し引いた値を、用量で除して比変異活性値 (誘発復帰変異コロニー数/mg) を求めた。

〔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 S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒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。ただし、2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が10以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

DMAEAについて 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した (Table 1)。その結果、S9 mix 無添加試験では、TA98 と TA1537 において 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、その他の検定菌においては 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では、WP2 *uvrA* 以外の検定菌において 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA98 と TA1537 の S9 mix 無添加試験は 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で、ともに上記の最高用量に基づいて公比2で5~6用量を設定して2回の本試験を実施した (Table 2、3)。その結果、TA98 の S9 mix 添加試験においては、本試験Iではいずれの用量においても溶媒対照値の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が、本試験IIの最高用量の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数を示した。また、TA98 の S9 mix 無添加試験と、その他の検定菌においては、溶媒対照値の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。

〔再現性試験〕

TA98 の S9 mix 添加試験では、本試験IIの最高用量の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ でのみ溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたため、再現性と用量依存性を確認するために、最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公差 800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で6用量を設定して再現性試験を実施した (Table 4)。その結果、用量依存的な変異コロニー数の増加が認められ、3400 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上では溶媒対照値の2倍以上となった。

TA98 の S9 mix 添加試験の、本試験Ⅱと再現性試験における比変異活性値を Appendix 2 に示した。当被験物質の最大比変異活性値は、10.6（再現性試験、3400 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ）で、同一条件下における陽性対照物質2-アミノアントラセンの値（508000）の約 50000分の1であった。

DMAEAについて実施したすべての試験において、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、溶媒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、本試験系の有効性が確認された。

【結 論】

以上の結果に基づき、アクリル酸2-(ジメチルアミノ) エチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有するもの（陽性）と判定した。

【特 記 事 項】

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。

【文 献】

- 1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: in "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D.M., Ames, B.N.: *Mutat. Res.* 113: 173-215 (1983)
- 3) Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360
- 4) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984) pp. 161-187

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	114	118	122	14	9	11	24	27	34	30	30	37	14	13	9	
		(118 \pm 4.0)			(11 \pm 2.5)			(28 \pm 5.1)			(32 \pm 4.0)			(12 \pm 2.6)			
	50.0	103			8			31			27			17			
	150	137			11			28			38			18			
	500	134			7			23			37			9			
	1500	154			11			27			23 *			1 *			
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
S9mix (+)	0	105	127	112	13	16	7	25	27	33	41	42	26	13	25	17	
		(115 \pm 11.2)			(12 \pm 4.6)			(28 \pm 4.2)			(36 \pm 9.0)			(18 \pm 6.1)			
	50.0	102			10			29			29			15			
	150	126			13			29			24			7			
	500	120			10			27			23			11			
	1500	147			9			26			69			6			
	5000	142 *			4 *			63			7 *			4 *			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	580	556	617	247	278	265	264	271	267	511	562	589	713	634	576	
		(584 \pm 30.7)			(263 \pm 15.6)			(267 \pm 3.5)			(554 \pm 39.6)			(641 \pm 68.8)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	553	680	677	328	335	343	497	505	454	317	327	308	281	275	310	
		(637 \pm 72.5)			(335 \pm 7.5)			(485 \pm 27.4)			(317 \pm 9.5)			(289 \pm 18.7)			

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.

Purity was 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinone were contained as impurities.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)															
		Base - pair substitution type						Frameshift type									
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	178	143	115	21	18	7	22	30	22	27	29	22	8	10	8	
		(145 ± 31.6)			(15 ± 7.4)			(25 ± 4.6)			(26 ± 3.6)			(9 ± 1.2)			
	78.1	ND			ND			ND			34	18	29	17	15	12	
											(27 ± 8.2)			(15 ± 2.5)			
	156	166	127	136	14	9	10	21	22	23	31	30	31	11	16	18	
		(143 ± 20.4)			(11 ± 2.6)			(22 ± 1.0)			(31 ± 0.6)			(15 ± 3.6)			
	313	139	114	118	11	6	11	30	30	24	22	33	34	11	9	15	
		(124 ± 13.4)			(9 ± 2.9)			(28 ± 3.5)			(30 ± 6.7)			(12 ± 3.1)			
625	147	116	153	12	7	6	23	27	25	31	37	31	12	20	16		
	(139 ± 19.9)			(8 ± 3.2)			(25 ± 2.0)			(33 ± 3.5)			(16 ± 4.0)				
1250	136	129	156	7	9	7	28	19	20	59	45	33 *	4	9	10 *		
	(140 ± 14.0)			(8 ± 1.2)			(22 ± 4.9)			(46 ± 13.0)			(8 ± 3.2)				
2500	169	193	180	11	8	13	36	34	27	8 *	16 *	12 *	7 *	2 *	4 *		
	(181 ± 12.0)			(11 ± 2.5)			(32 ± 4.7)			(12 ± 4.0)			(4 ± 2.5)				
5000	61 *	23 *	54 *	0 *	0 *	5 *	15 *	9 *	15 *								
	(46 ± 20.2)			(2 ± 2.9)			(13 ± 3.5)										
S9mix (+)	0	164	149	138	17	17	16	40	44	37	35	31	31	21	25	23	
		(150 ± 13.1)			(17 ± 0.6)			(40 ± 3.5)			(32 ± 2.3)			(23 ± 2.0)			
	156	126	124	126	15	13	7	ND			31	21	26	9	8	13	
		(125 ± 1.2)			(12 ± 4.2)						(26 ± 5.0)			(10 ± 2.6)			
	313	129	132	114	8	7	9	37	29	25	13	22	22	5	10	9	
		(125 ± 9.6)			(8 ± 1.0)			(30 ± 6.1)			(19 ± 5.2)			(8 ± 2.6)			
	625	158	127	153	15	8	10	29	28	29	21	16	20	8	12	9	
		(146 ± 16.6)			(11 ± 3.6)			(29 ± 0.6)			(19 ± 2.6)			(10 ± 2.1)			
1250	133	115	86	16	11	10	31	17	27	17	24	23	5	11	7		
	(111 ± 23.7)			(12 ± 3.2)			(25 ± 7.2)			(21 ± 3.8)			(8 ± 3.1)				
2500	138	123	102	8	20 *	20 *	28	27	26	28	26	23	5	5	8		
	(121 ± 18.1)			(16 ± 6.9)			(27 ± 1.0)			(26 ± 2.5)			(6 ± 1.7)				
5000	149	139	152	8 *	7 *	9 *	21	28	42	43	34	45	16	8	16 *		
	(147 ± 6.8)			(8 ± 1.0)			(30 ± 10.7)			(41 ± 5.9)			(13 ± 4.6)				
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	641	680	673	425	412	454	415	414	402	683	668	718	1924	1724	1891	
		(665 ± 20.8)			(430 ± 21.5)			(410 ± 7.2)			(690 ± 25.7)			(1846 ± 107.2)			

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.

Purity was 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinone were contained as impurities.

ND : Not done

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean \pm S.D.)																			
		Base - pair substitution type									Frameshift type										
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
S9mix (-)	0	140	125	147	13	9	9	25	36	28	24	13	21	8	6	7	(137 \pm 11.2)	(10 \pm 2.3)	(30 \pm 5.7)	(19 \pm 5.7)	(7 \pm 1.0)
	78.1	ND			ND			ND			28	22	24	8	8	11	(25 \pm 3.1)	(9 \pm 1.7)			
	156	115	114	123	8	10	12	28	27	23	26	19	23	13	11	8	(117 \pm 4.9)	(10 \pm 2.0)	(26 \pm 2.6)	(23 \pm 3.5)	(11 \pm 2.5)
	313	111	117	135	12	10	17	27	30	32	22	25	28	16	11	11	(121 \pm 12.5)	(13 \pm 3.6)	(30 \pm 2.5)	(25 \pm 3.0)	(13 \pm 2.9)
	625	127	133	135	6	10	8	27	28	24	29	34	38	9	11	11	(132 \pm 4.2)	(8 \pm 2.0)	(26 \pm 2.1)	(34 \pm 4.5)	(10 \pm 1.2)
	1250	121	104	118	12	8	7	32	28	26	43	27	39	2 *	5 *	6 *	(114 \pm 9.1)	(9 \pm 2.6)	(29 \pm 3.1)	(36 \pm 8.3)	(4 \pm 2.1)
	2500	160	161	169	10 *	10 *	12 *	41	42	33	10 *	9 *	5 *	2 *	3 *	2 *	(163 \pm 4.9)	(11 \pm 1.2)	(39 \pm 4.9)	(8 \pm 2.6)	(2 \pm 0.6)
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	2 *	8 *	24							(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(11 \pm 11.4)		
S9mix (+)	0	104	113	111	13	15	10	34	31	30	27	23	23	9	8	7	(109 \pm 4.7)	(13 \pm 2.5)	(32 \pm 2.1)	(24 \pm 2.3)	(8 \pm 1.0)
	156	104	115	133	15	17	12	ND			23	39	25	8	10	14	(117 \pm 14.6)	(15 \pm 2.5)		(29 \pm 8.7)	(11 \pm 3.1)
	313	137	108	110	11	12	12	28	30	38	30	30	35	3	8	6	(118 \pm 16.2)	(12 \pm 0.6)	(32 \pm 5.3)	(32 \pm 2.9)	(6 \pm 2.5)
	625	107	104	103	7	13	12	39	30	42	24	19	12	3	6	4	(105 \pm 2.1)	(11 \pm 3.2)	(37 \pm 6.2)	(18 \pm 6.0)	(4 \pm 1.5)
	1250	106	94	100	9	8	8	36	28	29	23	20	27	5	12	5	(100 \pm 6.0)	(8 \pm 0.6)	(31 \pm 4.4)	(23 \pm 3.5)	(7 \pm 4.0)
	2500	102	95	101	13	9	11	30	35	36	29	28	27	9	2	6	(99 \pm 3.8)	(11 \pm 2.0)	(34 \pm 3.2)	(28 \pm 1.0)	(6 \pm 3.5)
	5000	107	114	96	13 *	8 *	14 *	44	39	34	66	45	55	14	9 *	11 *	(106 \pm 9.1)	(12 \pm 3.2)	(39 \pm 5.0)	(55 \pm 10.5)	(11 \pm 2.5)
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							
	Number of colonies / plate	644	728	760	370	359	383	244	282	281	495	608	544	557	484	444	(711 \pm 59.9)	(371 \pm 12.0)	(269 \pm 21.7)	(549 \pm 56.7)	(495 \pm 57.3)
	Number of colonies / plate	440	456	431	333	342	317	523	499	534	321	355	296	255	311	324	(442 \pm 12.7)	(331 \pm 12.7)	(519 \pm 17.9)	(324 \pm 29.6)	(297 \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.

Purity was 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinone were contained as impurities.
ND : Not done

Table 4. Results of confirmation test in reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean \pm S.D.)					
					Frameshift type		
					TA98		
S9mix (+)	0				34 22 31 (29 \pm 6.2)		
	1000				23 20 27 (23 \pm 3.5)		
	1800				48 32 27 (36 \pm 11.0)		
	2600				63 54 52 (56 \pm 5.9)		
	3400				72 52 70 (65 \pm 11.0)		
	4200				79 74 57 (70 \pm 11.5)		
	5000				63 76 70 (70 \pm 6.5)		
Positive control S9 mix (+)	Chemical				2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)				0.5		
	Number of colonies / plate				281 255 313 (283 \pm 29.1)		

2AA: 2-Aminoanthracene

Purity was 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinone were contained as impurities.