イソチオシアン酸メチルの細菌を用いる復帰突然変異試験

最　終　報　告　書

作成日　2004年　10月　7日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目　　次

要　　約 …… 8
緒　　言 …… 10
方　　法 …… 10
1．被験物質，陽性対照物質，媒体対照物質及び陰性対照物質 …… 10
2．検体液 …… 11
3．試験菌株 …… 12
4．S9 mix …… 12
5．培地 …… 13
6．無菌試験 …… 13
7．試験方法 …… 13
8．試験の成立条件 …… 14
9．統計学的方法 …… 14
10．判定基準 …… 14
試験成績 …… 15
1．用量設定試験 …… 15
2．本試験(I)及び本試験(II) …… 15
考　　察 …… 16
文　　献 …… 16

Table及びFigureの目次

Table 1	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (dose-finding test)	21
Table 2-1	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test I)	22
Table 2-2	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test I)	23
Table 3-1	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test II)	24
Table 3-2	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test II)	25
Figure 1-1	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (dose-finding test :without S9 mix).	26
Figure 1-2	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (dose-finding test :with S9 mix).	26
Figure 2-1	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test I:without S9 mix).	27
Figure 2-2	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test I:without S9 mix).	27
Figure 2-3	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test I:with S9 mix).	28
Figure 2-4	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test I:with S9 mix).	28
Figure 3-1	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test II:without S9 mix).	29
Figure 3-2	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test II:without S9 mix).	29
Figure 3-3	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test II:with S9 mix).	30
Figure 3-4	Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test II:with S9 mix).	30

要　約

イソチオシアン酸メチルの遺伝子突然変異誘発性の有無を，細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した．

試験菌株には*Salmonella typhimurium* のTA100，TA98，TA1535及びTA1537並びに*Escherichia coli* のWP2*uvrA*を用いた．試験は，プレインキュベーション法により，S9 mix無添加とS9 mix添加の場合について実施した．

1.　用量設定試験

本試験(I) 及び本試験(II)の試験濃度を設定するために用量設定試験を行った．試験濃度は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，全菌株0.305～5000 μg/plate（公比4，計8濃度）とした．

1.1 プレート上の析出物

S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの濃度においてもプレート上に析出物は認められなかった．

1.2 菌の生育阻害

S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，TA100，TA1535及びTA1537では78.1 μg/plate以上の濃度において，WP2*uvrA*では312.5 μg/plate以上の濃度において，TA98では19.5 μg/plate以上の濃度において菌の生育阻害が認められた．

1.3 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株においても媒体対照（無水エタノール）の2倍未満であった．

2.　本試験(I)及び本試験(II)

用量設定試験の結果から本試験(I)及び本試験(II)の濃度は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，菌の生育阻害を示さないと考えられる濃度が4濃度以上含まれるように公比2で6濃度，すなわち，TA100，TA1535及びTA1537では，2.44，4.88，9.77，19.5，39.1及び78.1 μg/plate，WP2*uvrA*では，9.77，19.5，39.1，78.1，156.3及び312.5 μg/plate ，TA98では0.610，1.22，2.44，4.88，9.77及び19.5 μg/plateとした．

2.1 プレート上の析出物

S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの濃度においてもプレート上に析出物は認められなかった．

2.2 菌の生育阻害

S9 mix無添加の場合，TA100では最高濃度の78.1 μg/plateにおいて，TA1535及びTA1537では39.1 μg/plate以上の濃度において，WP2*uvrA*では156.3 μg/plate以上の濃度において，TA98では最高濃度の19.5 μg/plateにおいて菌の生育阻害が認められた．S9 mix添加の場合，TA100では最高濃度の78.1 μg/plateにおいて，TA1535及びTA1537では39.1 μg/plate以上の濃度において，WP2*uvrA*では最高濃度の312.5 μg/plateにおいて，TA98では最高濃度の19.5 μg/plateにおいて菌の生育阻害が認められた．

2.3 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株においても媒体対照（無水エタノール）の2倍未満であった．

3. 媒体対照

媒体対照における復帰変異コロニー数は，用量設定試験，本試験(Ⅰ)及び本試験(Ⅱ)とも陰性対照（注射用水）における値と同程度であった．

4. 陽性対照及び陰性対照

用量設定試験，本試験(I)及び本試験(II)で用いた陽性対照物質は明らかな陽性結果を示し，陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は，試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった．

5. 試験の再現性

本試験(I)及び本試験(II)の結果には再現性が認められた．

以上の結果，イソチオシアン酸メチルはいずれの濃度においても，復帰変異コロニー数が媒体対照の2倍以上に増加しなかったことから，当試験の条件下において，イソチオシアン酸メチルに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する．

緒　言

イソチオシアン酸メチルの安全性に関する非臨床試験の一環として，細菌を用いる復帰突然変異試験を行い，その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した．

方　法

1．被験物質，陽性対照物質，媒体対照物質及び陰性対照物質

1.1 被験物質

被験物質のイソチオシアン酸メチル（CAS No.556-61-6）は，分子量：73.12，水に不溶，エタノール，クロロホルムに混和，通常，安定な黄褐色澄明の液体である．

当試験には，厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室から提供されたものを用いた（製造元：[illegible]，ロット番号：[illegible]，純度：99.8 %）．

入手後は，試験施設の被験物質保管室の保管庫に冷蔵（2～10 °C）・遮光の条件下で保管した．

なお，財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所に残余被験物質を返却し，その検査成績書を入手したところ，いずれの検査結果も製造元における規格値内であり，また，入手時と同結果であったことから，使用期間中の安定性に問題はなかったものと判断した．

1.2 陽性対照物質

試験には下記の物質を使用した．

1.2.1　2-アミノアントラセン（2-aminoanthracene，略名：2AA）

黄色から緑色の粉末，純度：97.4 %，ロット番号：90K3670，購入源：SIGMA，使用期限：2007年1月7日（自社規定），保管条件：冷蔵（2～8 °C）・防湿．

1.2.2　アジ化ナトリウム（sodium azide，略名：NaN_3）

白色～ほとんど白色の結晶（特級，単品），純度：99.7 %，ロット番号：M8K9848，購入源：ナカライテスク株式会社，使用期限：2003年11月18日（自社規定），保管条件：冷蔵（1～10 °C）．

1.2.3　9-アミノアクリジン（9-aminoacridine hydrochloride，略名：9AA）

黄色の粉末（特級，単品），純度：98.3 %，ロット番号：M8F1294，購入源：ナカライテスク株式会社，使用期限：2003年11月18日（自社規定），保管条件：冷蔵（1～10 °C）．

1.2.4　2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド［2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide，略名：AF-2］

黄みの赤色結晶性粉末（特級，単品），純度：99.0 %，ロット番号：SEL1402，購入源：和光純薬工業株式会社，使用期限：2007年2月4日（自社規定），保管条件：冷蔵（1～10 °C）・遮光．

1.3 媒体対照物質

媒体対照物質には，被験物質の媒体である無水エタノール（局方品，ロット番号：LF5585，株式会社ワコーケミカル，使用期限：2005年5月11日（自社規定），保管条件：室温）を用いた．

1.4 陰性対照物質

陰性対照物質には，注射用水（局方品，ロット番号：K1I80，株式会社大塚製薬工場）を用いた．

2．検体液

2.1 被験物質

用量設定試験では，被験物質200 mgを無水エタノールに混和して2mLとし，最高濃度液（100 mg/mL）を調製した．本試験(I) 及び本試験(II)では，被験物質25 mgを無水エタノールに混和して4 mLとし，最高濃度液（6.25 mg/mL）を調製した．最高濃度液より低い濃度液は，用量設定試験，本試験(I) 及び本試験(II)とも最高濃度液から無水エタノールで順次希釈して調製した．調製は用時に行い，使用後の残液は廃棄処分した．

2.2 陽性対照物質

2AA，9AA及びAF-2はジメチルスルホキシド（以下DMSOと略，紫外部吸収スペクトル用，ロット番号：2AA及びAF-2；LR170，9AA；KC066，株式会社同仁化学研究所）に，NaN_3は注射用水（局方品，ロット番号：K1C78，株式会社大塚製薬工場）に溶解して，以下に示す濃度液を調製した（2AAの調製日：2002年7月25日，9AA及びNaN_3の調製日：2002年10月28日，AF-2の調製日：2003年1月31日，各調製液の使用期限は調製後1年以内とした）．

各調製液は，チューブ（2 mL容セラムチューブ，住友ベークライト株式会社）に0.5 mLずつ分注し，-80 °C設定の冷凍庫［型式：MDF-291AT（被験物質保管庫 No.8），三洋電機株式会社］内に凍結保管した．試験の際には各調製液を融解して使用し，使用後の残液は廃棄処分した．

	菌株名	物質名	調製濃度 (μg/mL)	試験濃度 (μg/plate)
S9 mix (＋)	TA100	2AA	10	1
	TA1535	2AA	20	2
	WP2*uvrA*	2AA	100	10
	TA98	2AA	5	0.5
	TA1537	2AA	20	2
S9 mix (－)	TA100	AF-2	0.1	0.01
	TA1535	NaN_3	5	0.5
	WP2*uvrA*	AF-2	0.1	0.01
	TA98	AF-2	1	0.1
	TA1537	9AA	800	80

陽性対照物質は，その反応性が試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあったことから，生物学的に充分な活性を有していたと判断した．

3．試験菌株

試験菌株には，国内各GLP準拠毒性試験ガイドラインにおいて規定されており，変異原性物質に対する感受性が高く，細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている*S.typhimurium*のTA100，TA98，TA1535及びTA1537並びに*E.coli*のWP2*uvrA*を使用した．TA100及びTA98は1996年10月18日に，TA1535，TA1537及びWP2*uvrA*は1995年2月25日に，いずれも中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センターから入手した．

菌株の特性として「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインとGLP-」[1]に従い，アミノ酸要求性，紫外線感受性，膜変異rfa特性及び薬剤耐性因子R-factorプラスミドの有無を検査し(TA100及びTA98の検査日：2002年2月26日～2月28日，TA1535，TA1537及びWP2*uvrA*の検査日：2001年11月6日～11月8日），試験施設の基準に適合しているコロニーを選択した（Attachment 1）．

菌株は，特性検査の結果から選択したコロニーを培養した菌懸濁液0.8 mLに対してDMSOを0.07 mLの割合で加えたものを，チューブ(2 mL容セラムチューブ，住友ベークライト株式会社)に200μLずつ分注し，-80 °C設定の冷凍庫［型式：BFV-130(LR)，エスペック株式会社］内に凍結保管した（TA100及びTA98の分注日：2002年4月10日，TA1535，TA1537及びWP2*uvrA*の分注日：2001年12月26日，使用期限：分注後2年以内）．

菌の前培養には，OXOID NUTRIENT BROTH No.2（ロット番号：219916，OXOID LTD.）2.0 gに注射用水80 mLの割合で加えて高圧蒸気滅菌（121 °C，15分）した培養液を使用した．乾熱滅菌（180 °C，1時間，以下同様）したモルトン栓付のＬ字管（容量：約40 mL）に先の培養液を10 mL分注し，ここへ融解した菌液を20 μL接種した．これを往復振盪型式（振盪数：90回／分，振幅：4 cm）の振盪器（型式：M-100^{N}，タイテック株式会社）を用いて，37 °Cで8時間振盪培養した．培養終了後，菌懸濁液の濁度を測定し，そのO.D.値から生菌数を求めた（Attachment 2）．また，菌懸濁液は使用時まで室温で保管した．

なお，実験操作は空調管理されたAmes試験室（A棟）にて行った．

4．S9 mix

S9は，Attachment 3の条件により2003年1月17日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの（ロット番号：03011711）を使用した．S9は，2003年2月5日に購入し，使用時まで-80°C設定の冷凍庫［型式：BFV-130(LR)，エスペック株式会社］内に凍結保管した．

S9 mixは，S9 mix用のCofactor（商品名：Cofactor-Ⅰ，ロット番号：999301，オリエンタル酵母工業株式会社）を注射用水で溶解し，メンブランフィルター（φ0.2 μm，Nalge）で濾過した後，使用直前にS9を加えて調製した．S9 mixの組成をAttachment 4に示した．

5．培地

最少グルコース寒天平板培地は，テスメディアAN培地(ロット番号：ANI110BS，製造日：2003年2月12日，オリエンタル酵母工業株式会社)を使用した．テスメディアAN培地の組成をAttachment 5に示した．

トップアガーは，注射用水にBacto Agar（ロット番号：2120028，DIFCO）が0.6 %，塩化ナトリウムが0.5 %の割合になるように加えて高圧蒸気滅菌（121 °C，20分，以下同様）した．この水溶液に*S. typhimurium*の場合には0.5 mmol/L L-ヒスチジンと0.5 mmol/L D-ビオチンを混合した水溶液を，*E.coli*の場合には0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を，それぞれ容量比10：1の割合で加えて調製した．なお，各アミノ酸溶液はフィルターシステム（ϕ0.22 μm，CORNING）で濾過したものを使用した．

6．無菌試験

被験物質の最高濃度液及びS9 mixの無菌試験は，用量設定試験，本試験(I) 及び本試験(II)実施の際に，それぞれ2枚のプレートを用いて実施した．

試験は，被験物質の最高濃度液0.05 mLまたはS9 mix 0.5 mLに，45 °Cに保温したトップアガー2 mLを加えて最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ，プレートを転倒して37 °C設定の恒温器（型式： IA-81，ヤマト科学株式会社）内で約48時間培養した後，コロニーの出現を調べた．被験物質の最高濃度液の無菌試験には，用量設定試験では100 mg/mL濃度液を，本試験(I) 及び本試験(II) では6.25 mg/mL濃度液を用いた．

7．試験方法

7.1 試験操作

試験条件をAttachment 6に示した．

試験は，プレインキュベーション法により，代謝活性化によらない場合（S9 mix無添加）と代謝活性化による場合（S9 mix添加）で行った．すなわち，乾熱滅菌した試験管（15.5×100 mm，清浄試験管ラルボ，テルモ株式会社）に，①被験物質検体液，媒体対照液及び陰性対照液0.05 mL，陽性対照液0.1 mL，②高圧蒸気滅菌した0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液（pH7.4）0.5 mL（代謝活性化によらない場合）またはS9 mix 0.5 mL（代謝活性化による場合），③菌懸濁液0.1 mLの順に加え，往復振盪型式の振盪器を用いて37 °Cで20分間インキュベーションした．その後，45 °Cに保温したトップアガーを2 mL加えて混合した後，最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ，プレートを転倒して37 °C設定の恒温器内で約48時間培養した．

培養終了後，プレート上での析出物の有無を肉眼で観察した後，復帰変異コロニー数を，コロニーアナライザー（CA-11D　エームステストシステム）により計測し，その後，菌の生育阻害の有無を100倍の顕微鏡下で観察した．プレート上での析出物の有無は，培養開始時にも肉眼で観察した．

・プレートは，菌株，代謝活性化の有無及び濃度の組み合わせごとに用量設定試験では1枚，本試験(I) 及び本試験(II)では各3枚使用した．また，試験管及びプレートは，菌株ごとに油性インクで色分けすることで識別した．

7.2 用量設定試験

用量設定試験の試験濃度は，「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成9年10月31日）に従い，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株も5000μg/plateを最高濃度として，以下公比4で1250，312.5，78.1，19.5，4.88，1.22及び0.305μg/plateの計8濃度を設定した．対照として，全菌株に対し媒体対照，陰性対照及び陽性対照を設けた．

7.3 本試験(I) 及び本試験(II)

用量設定試験の結果から本試験の濃度は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，菌の生育阻害を示さないと考えられる濃度が4濃度以上含まれるように公比2で6濃度，すなわち，TA100，TA1535及びTA1537では，2.44，4.88，9.77，19.5，39.1及び78.1 μg/plate，WP2*uvrA*では，9.77，19.5，39.1，78.1，156.3及び312.5 μg/plate，TA98では0.610，1.22，2.44，4.88，9.77及び19.5 μg/plateとした．対照として，全菌株に対し媒体対照，陰性対照及び陽性対照を設けた．

8．試験の成立条件

無菌試験で被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入がなく，媒体対照の復帰変異コロニー数が陰性対照の復帰変異コロニー数と同程度であり，また，陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数が試験施設のバックグラウンドデータ（Attachment 7）の範囲内にあり，さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験が成立するものとした．

9．統計学的方法

復帰変異コロニー数は，濃度ごとに平均値と標準偏差を算出した．なお，有意差検定は実施しなかった．

10．判定基準

試験の結果は，被験物質を処理したプレートにおける復帰変異コロニー数が媒体対照の2倍以上の値を示し，さらに濃度に依存して増加した場合を陽性とした．

試験成績

1．用量設定試験

用量設定試験の結果をTable 1及びFigure 1-1～1-2に示した．

被験物質を処理したプレート上の析出物は，培養開始時及び培養終了時とも，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合のいずれの濃度においても認められなかった．

菌の生育阻害は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，TA100，TA1535及びTA1537では78.1 μg/plate以上の濃度において，WP2*uvrA*では312.5 μg/plate以上の濃度において，TA98では19.5 μg/plate以上の濃度において認められた．

復帰変異コロニー数は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株においても媒体対照の2倍未満であった．

媒体対照における復帰変異コロニー数は，いずれの菌株も陰性対照における値と同程度であった．

無菌試験では，被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった．

陽性対照物質は，明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した．また，陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は，試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった．

2．本試験(I) 及び本試験(II)

本試験(I)の結果をTable 2-1～2-2及びFigure 2-1～2-4に，本試験(II)の結果をTable 3-1～3-2及びFigure 3-1～3-4に示した．

被験物質を処理したプレート上の析出物は，培養開始時及び培養終了時とも，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合のいずれの濃度においても認められなかった．

菌の生育阻害は，S9 mix無添加の場合，TA100では最高濃度の78.1 μg/plateにおいて，TA1535及びTA1537では39.1 μg/plate以上の濃度において，WP2*uvrA*では156.3 μg/plate以上の濃度において，TA98では最高濃度の19.5 μg/plateにおいて認められた．S9 mix添加の場合，TA100では最高濃度の78.1 μg/plateにおいて，TA1535及びTA1537では39.1 μg/plate以上の濃度において，WP2*uvrA*では最高濃度の312.5 μg/plateにおいて，TA98では最高濃度の19.5 μg/plateにおいて認められた．

復帰変異コロニー数は，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株においても媒体対照の2倍未満であった．

媒体対照における復帰変異コロニー数は，いずれの菌株も陰性対照における値と同程度であった．

無菌試験では，被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった．

陽性対照物質は，明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した．また，陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は，試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった．

考　察

イソチオシアン酸メチルの遺伝子突然変異誘発性の有無を，細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した．

イソチオシアン酸メチルは，S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも，いずれの菌株のすべての濃度において，復帰変異コロニー数は媒体対照の2倍以上に増加しなかった．

各試験における無菌試験では，被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった．

各試験における媒体対照の復帰変異コロニー数は，陰性対照における値と同程度であった．また，陽性対照物質は，明らかな復帰変異コロニー数の増加を示し，陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は，試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった．

本試験(I) 及び本試験(II)には再現性が認められた．

以上の結果，イソチオシアン酸メチルはいずれの濃度においても，復帰変異コロニー数が媒体対照の2倍以上に増加しなかったことから，当試験の条件下において，イソチオシアン酸メチルに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する．なお，イソチオシアン酸メチルは当試験施設で同時期に実施した哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性の結果が得られている[2)]．また，イソチオシアン酸メチルは，*B.subtilis* を用いた DNA 修復試験，*S.typhimurium/E.coli* を用いた復帰変異試験，ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験，マウスを用いた小核試験で陰性，培養細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験において陽性の報告がある[3)]．

文　献

1）労働省安全衛生部化学物質調査課（編）：安衛法における変異原性試験ーテストガイドラインとGLPー，中央労働災害防止協会，平成3年3月．

2）三輪芳久ら：イソチオシアン酸メチルの哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験（試験番号：971022），株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所（2004）．

3）Nihon Shering Co./Shionogi Pharm.Co.: J.Pesticide Sci.,15-297-304（1990）．

Table 1. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (dose-finding test)

With (+) or Without (−) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (−)	Negative control	117	10	42	12	4
	Vehicle control	109	7	31	14	9
	0.305	114	4	53	14	11
	1.22	90	13	41	23	5
	4.88	106	5	36	18	3
	19.5	137	10	30	27*	17
	78.1	133*	4*	37	2*	1*
	312.5	42*	0*	20*	2*	3*
	1250	0*	0*	0*	0*	0*
	5000	0*	0*	0*	0*	0*
S9 mix (+)	Negative control	118	12	45	25	12
	Vehicle control	113	9	56	22	17
	0.305	125	10	39	24	10
	1.22	119	5	50	19	10
	4.88	101	9	48	25	15
	19.5	90	6	36	40*	14
	78.1	123*	5*	33	4*	11*
	312.5	15*	1*	49*	3*	2*
	1250	0*	0*	0*	0*	0*
	5000	0*	0*	0*	0*	0*
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	504	478	122	395	465
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration (μg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	904	287	930	367	113

Negative control: Distilled water.
Vehicle control: Absolute ethanol.
AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride; 2AA: 2-Aminoanthracene.
*: Bacterial growth inhibition was observed.

Table 2-1. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test Ⅰ)

With (+) or Without (−) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (−)	Negative control	80 99 100 (93±11.3)	6 10 10 (9±2.3)	33 40 47 (40±7.0)	16 22 22 (20±3.5)	10 10 11 (10±0.6)
	Vehicle control	84 100 108 (97±12.2)	10 11 12 (11±1.0)	42 42 44 (43±1.2)	27 29 38 (31±5.9)	8 9 14 (10±3.2)
	0.610				18 25 30 (24±6.0)	
	1.22				18 26 27 (24±4.9)	
	2.44	84 90 93 (89±4.6)	5 5 12 (7±4.0)		19 20 26 (22±3.8)	4 5 9 (6±2.6)
	4.88	91 101 105 (99±7.2)	5 6 11 (7±3.2)		20 21 26 (22±3.2)	6 11 15 (11±4.5)
	9.77	90 94 100 (95±5.0)	6 7 10 (8±2.1)	36 38 51 (42±8.1)	20 26 26 (24±3.5)	6 8 13 (9±3.6)
	19.5	91 102 106 (100±7.8)	2 6 6 (5±2.3)	43 46 47 (45±2.1)	16* 25* 35* (25±9.5)	11 11 12 (11±0.6)
	39.1	107 110 112 (110±2.5)	10* 12* 13* (12±1.5)	28 38 38 (35±5.8)		12* 13* 13* (13±0.6)
	78.1	88* 94* 133* (105±24.4)	6* 10* 11* (9±2.6)	38 38 51 (42±7.5)		3* 5* 10* (6±3.6)
	156.3			52* 59* 66* (59±7.0)		
	312.5			37* 42* 63* (47±13.8)		
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	464 476 556 (499±50.0)	517 547 566 (543±24.7)	131 157 158 (149±15.3)	432 444 451 (442±9.6)	224 291 331 (282±54.1)

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

( ) : Mean±S.D.

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride.

*: Bacterial growth inhibition was observed.

Table 2-2. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test Ⅰ)

With (+) or Without (−) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	97 111 135 (114±19.2)	9 10 18 (12±4.9)	34 39 44 (39±5.0)	26 34 36 (32±5.3)	11 19 19 (16±4.6)
	Vehicle control	116 121 123 (120±3.6)	6 9 12 (9±3.0)	41 45 48 (45±3.5)	36 38 45 (40±4.7)	7 13 16 (12±4.6)
	0.610				26 33 35 (31±4.7)	
	1.22				20 27 40 (29±10.1)	
	2.44	102 106 116 (108±7.2)	5 7 12 (8±3.6)		34 39 39 (37±2.9)	10 18 18 (15±4.6)
	4.88	100 100 107 (102±4.0)	10 11 13 (11±1.5)		30 35 46 (37±8.2)	11 14 18 (14±3.5)
	9.77	92 100 111 (101±9.5)	7 9 9 (8±1.2)	45 46 52 (48±3.8)	26 33 40 (33±7.0)	11 12 13 (12±1.0)
	19.5	89 99 106 (98±8.5)	5 9 12 (9±3.5)	32 41 44 (39±6.2)	27* 38* 45* (37±9.1)	11 12 23 (15±6.7)
	39.1	105 112 117 (111±6.0)	8* 11* 15* (11±3.5)	39 42 42 (41±1.7)		16* 16* 26* (19±5.8)
	78.1	104* 123* 139* (122±17.5)	3* 8* 13* (8±5.0)	33 34 42 (36±4.9)		9* 15* 17* (14±4.2)
	156.3			34 42 56 (44±11.1)		
	312.5			47* 52* 54* (51±3.6)		
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration (μg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	971 1001 1062 (1011±46.4)	284 288 314 (295±16.3)	789 813 928 (843±74.3)	385 416 452 (418±33.5)	156 184 189 (176±17.8)

Negative control: Distilled water.
Vehicle control: Absolute ethanol.
( ) : Mean±S.D.
2AA: 2-Aminoanthracene.
*: Bacterial growth inhibition was observed.

Table 3-1. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test II)

With (+) or Without (−) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (−)	Negative control	122 129 132 (128±5.1)	4 8 11 (8±3.5)	35 37 37 (36±1.2)	14 16 21 (17±3.6)	9 14 18 (14±4.5)
	Vehicle control	111 143 145 (133±19.1)	4 7 9 (7±2.5)	29 39 40 (36±6.1)	13 21 26 (20±6.6)	12 16 18 (15±3.1)
	0.610				19 26 28 (24±4.7)	
	1.22				19 24 25 (23±3.2)	
	2.44	103 106 110 (106±3.5)	6 10 10 (9±2.3)		17 20 26 (21±4.6)	10 10 14 (11±2.3)
	4.88	102 125 126 (118±13.6)	7 10 11 (9±2.1)		22 27 31 (27±4.5)	7 12 17 (12±5.0)
	9.77	104 110 121 (112±8.6)	7 7 8 (7±0.6)	25 31 32 (29±3.8)	22 28 28 (26±3.5)	16 17 24 (19±4.4)
	19.5	89 109 122 (107±16.6)	7 10 11 (9±2.1)	27 31 31 (30±2.3)	25* 30* 35* (30±5.0)	11 14 18 (14±3.5)
	39.1	97 129 135 (120±20.4)	4* 6* 10* (7±3.1)	29 32 45 (35±8.5)		11* 14* 16* (14±2.5)
	78.1	107* 108* 127* (114±11.3)	9* 13* 13* (12±2.3)	33 42 61 (45±14.3)		6* 10* 12* (9±3.1)
	156.3			46* 47* 54* (49±4.4)		
	312.5			25* 36* 37* (33±6.7)		
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	539 555 577 (557±19.1)	467 496 531 (498±32.0)	144 146 173 (154±16.2)	410 413 454 (426±24.6)	391 412 416 (406±13.4)

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

( ) : Mean±S.D.

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride.

*: Bacterial growth inhibition was observed.

Table 3-2. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria (mutagenicity test II)

With (+) or Without (−) S9 mix	Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	114 147 153 (138±21.0)	7 13 13 (11±3.5)	40 49 50 (46±5.5)	25 27 40 (31±8.1)	18 22 25 (22±3.5)
	Vehicle control	122 124 140 (129±9.9)	5 11 12 (9±3.8)	37 38 40 (38±1.5)	21 27 30 (26±4.6)	12 19 20 (17±4.4)
	0.610				28 31 35 (31±3.5)	
	1.22				37 40 55 (44±9.6)	
	2.44	99 111 124 (111±12.5)	6 8 10 (8±2.0)		34 37 45 (39±5.7)	17 20 21 (19±2.1)
	4.88	105 113 133 (117±14.4)	7 8 9 (8±1.0)		31 34 46 (37±7.9)	9 14 19 (14±5.0)
	9.77	106 119 128 (118±11.1)	5 7 12 (8±3.6)	32 35 35 (34±1.7)	32 34 37 (34±2.5)	18 23 24 (22±3.2)
	19.5	108 116 123 (116±7.5)	5 8 10 (8±2.5)	30 33 40 (34±5.1)	28* 37* 38* (34±5.5)	13 15 18 (15±2.5)
	39.1	101 124 150 (125±24.5)	6* 11* 12* (10±3.2)	46 51 53 (50±3.6)		14* 22* 22* (19±4.6)
	78.1	126* 126* 133* (128±4.0)	7* 9* 10* (9±1.5)	37 38 42 (39±2.6)		12* 16* 25* (18±6.7)
	156.3			38 52 52 (47±8.1)		
	312.5			39* 39* 53* (44±8.1)		
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration (μg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	969 1017 1117 (1034±75.5)	287 294 300 (294±6.5)	902 908 1101 (970±113.2)	402 408 410 (407±4.2)	152 179 181 (171±16.2)

Negative control: Distilled water.
Vehicle control: Absolute ethanol.
( ) : Mean±S.D.
2AA: 2-Aminoanthracene.
*: Bacterial growth inhibition was observed.

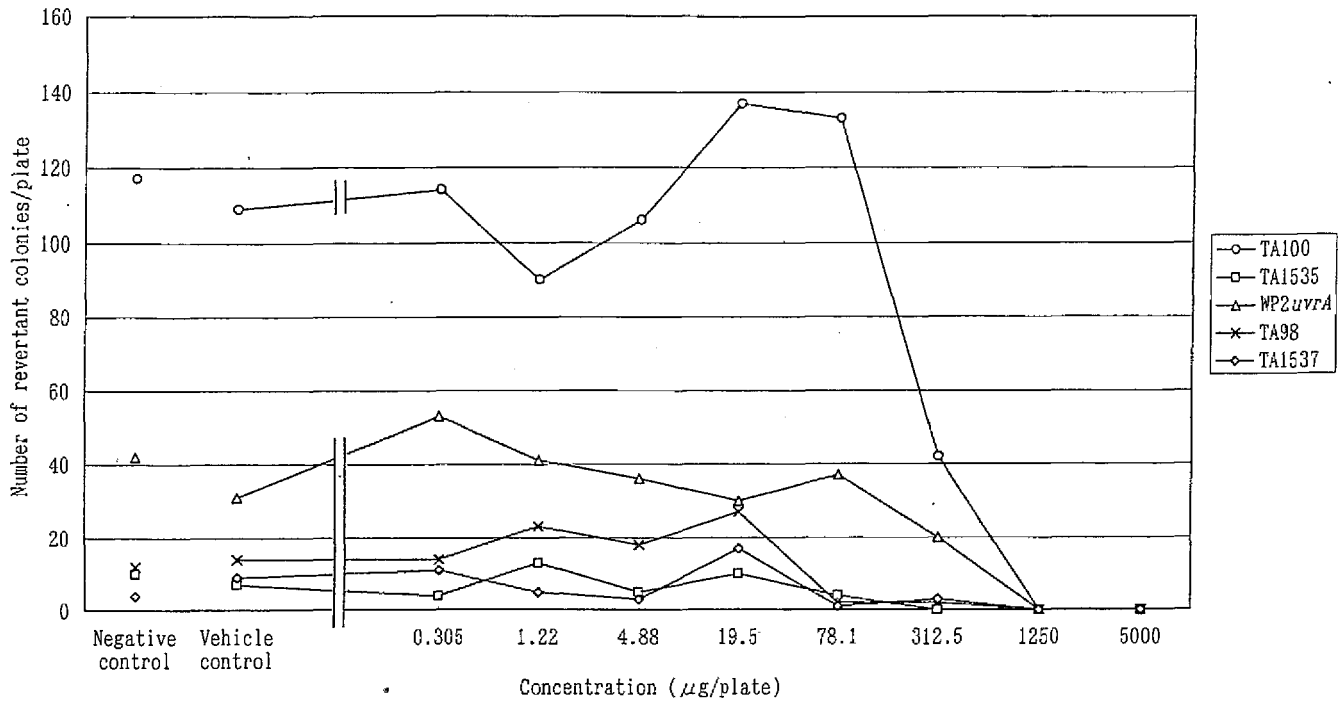

Figure 1-1. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria
(dose-finding test: without S9 mix)

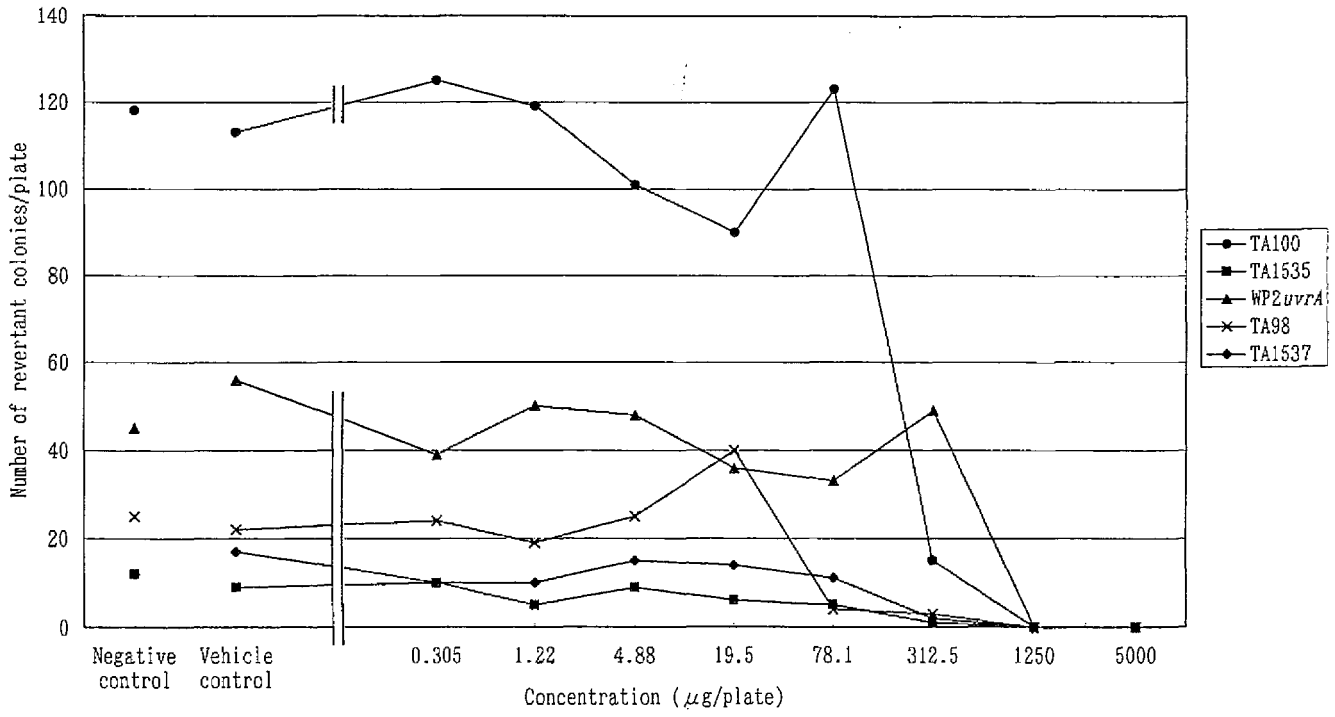

Figure 1-2. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria
(dose-finding test: with S9 mix)

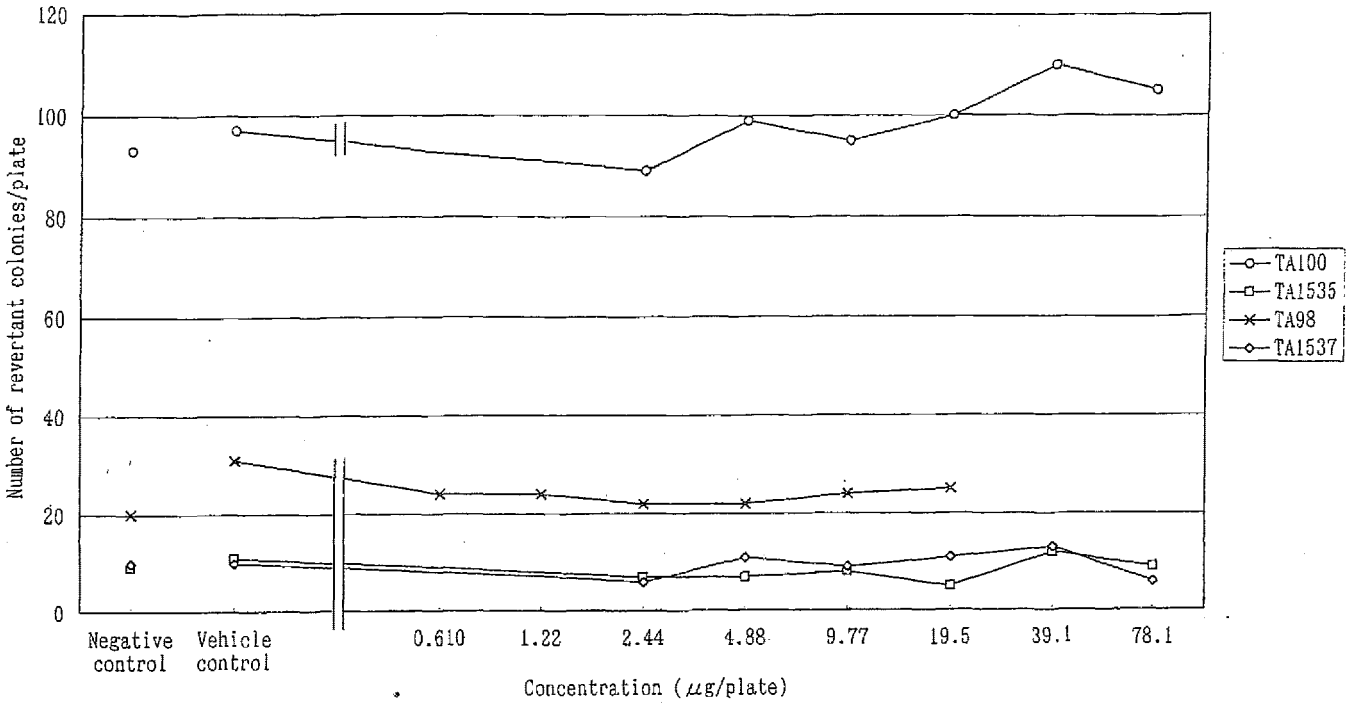

Figure 2-1. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria
(mutagenicity test I : without S9 mix)

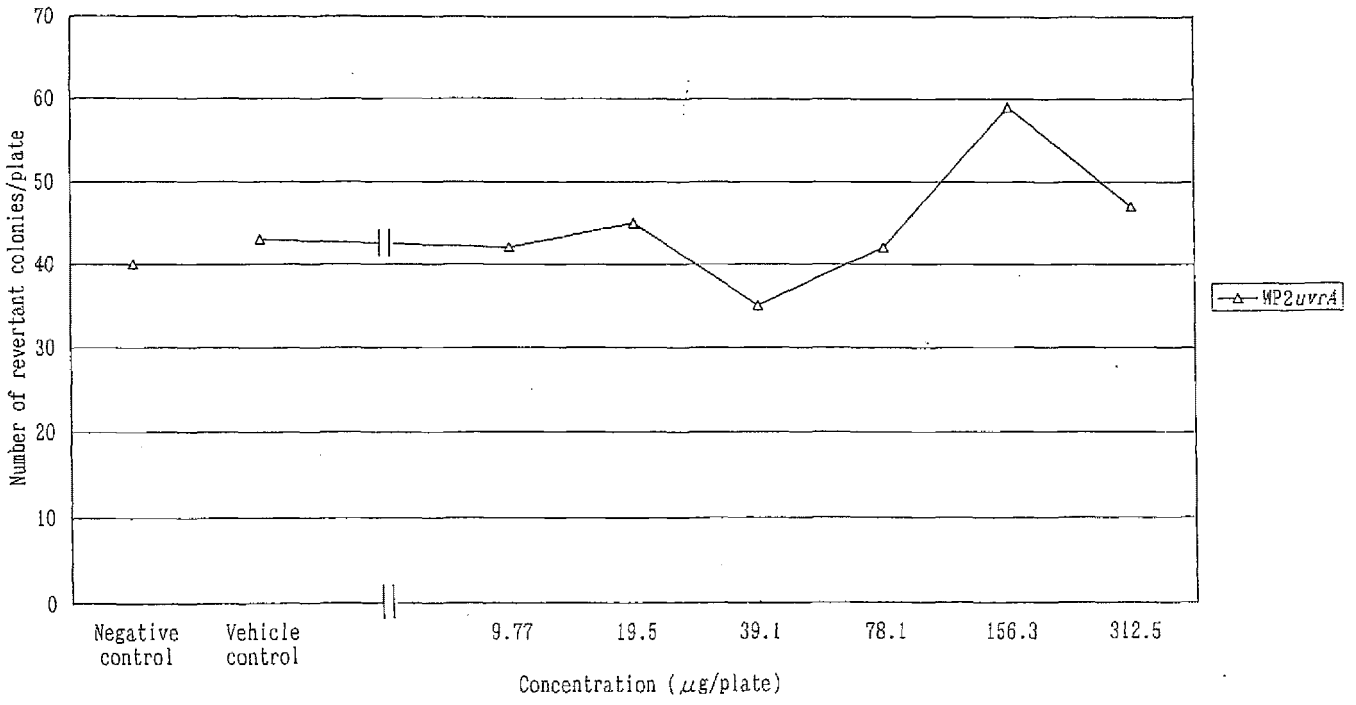

Figure 2-2. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria
(mutagenicity test I : without S9 mix)

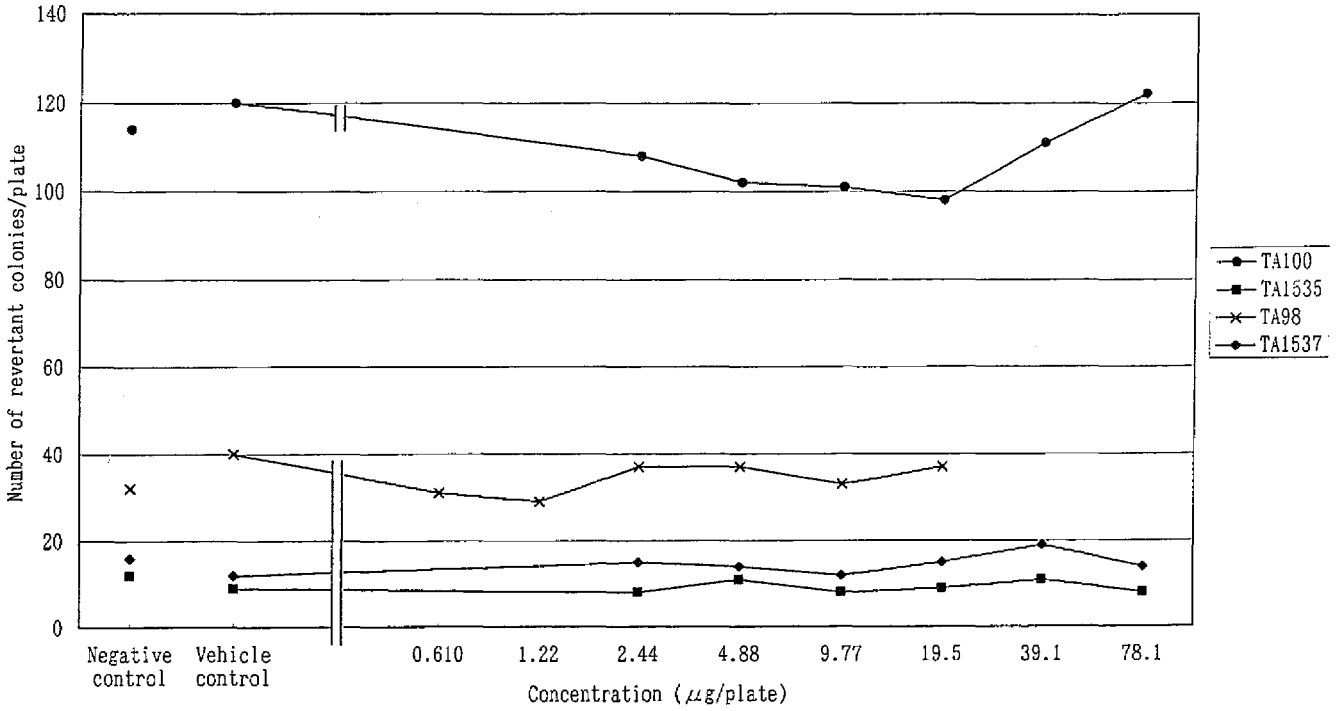

Figure 2-3. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria
(mutagenicity test I : with S9 mix)

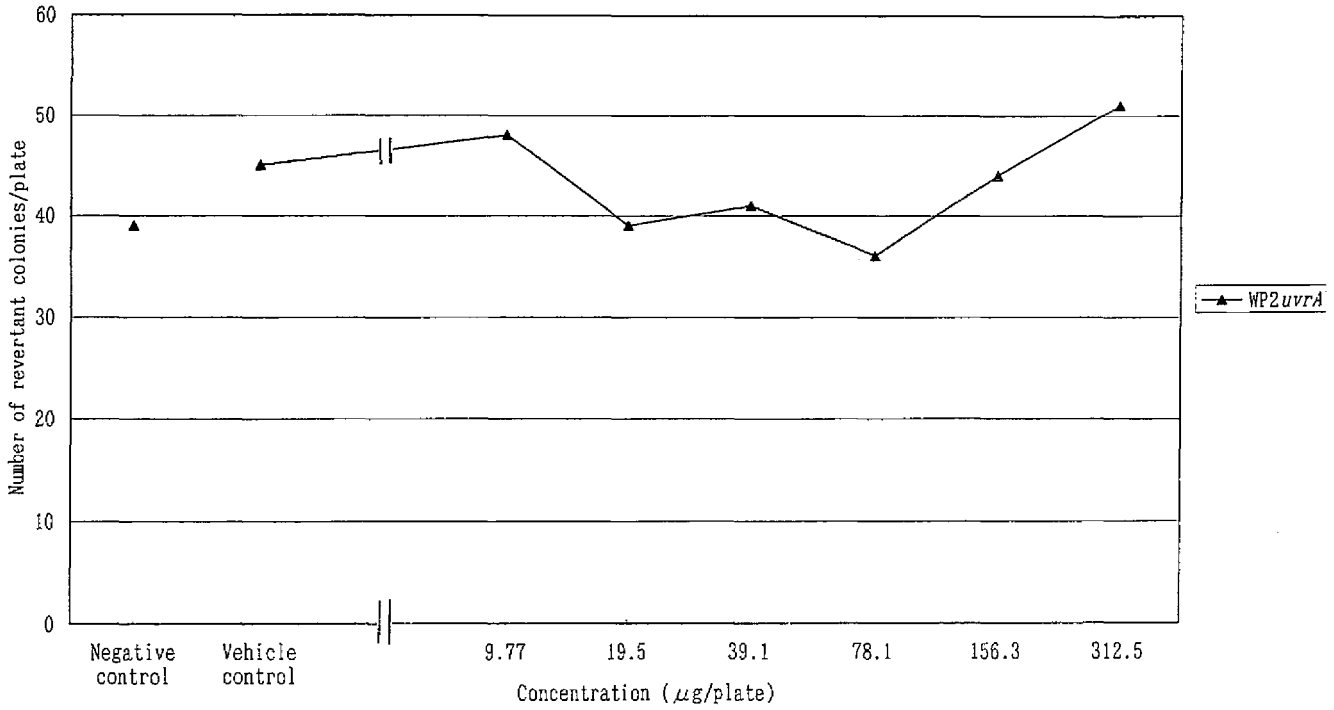

Figure 2-4. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria
(mutagenicity test I : with S9 mix)

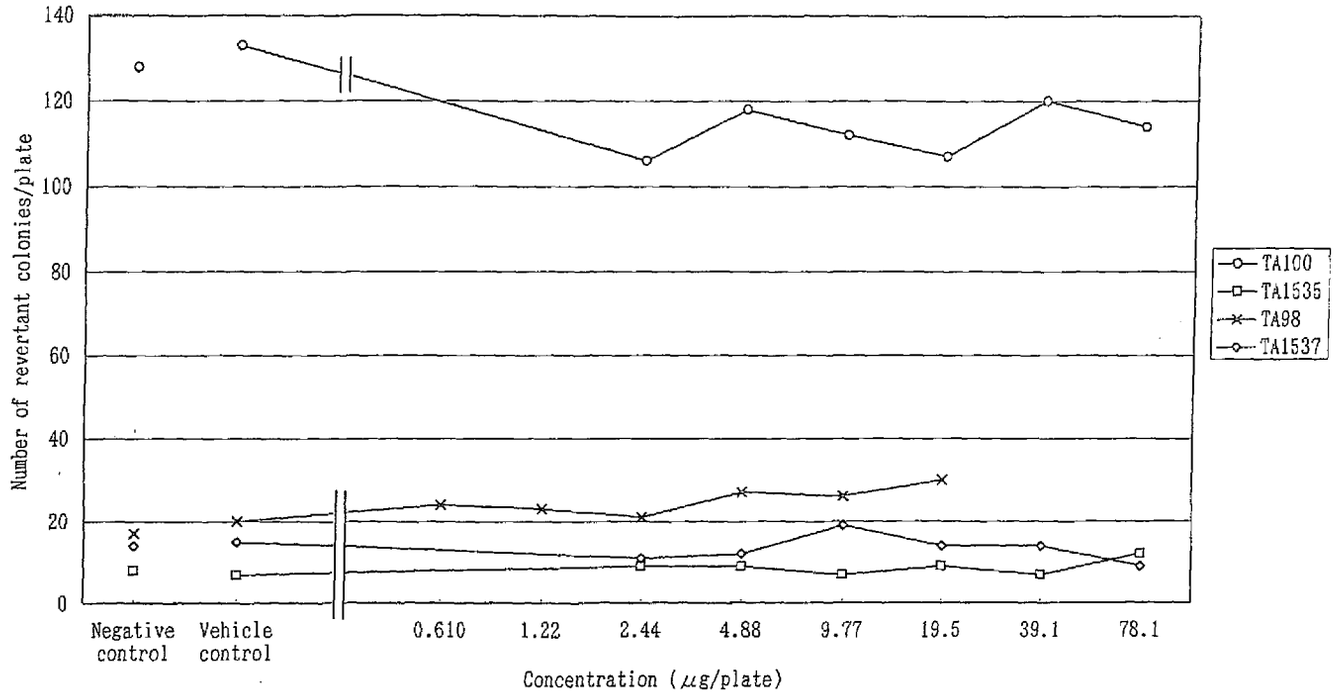

Figure 3-1. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria
(mutagenicity test II: without S9 mix)

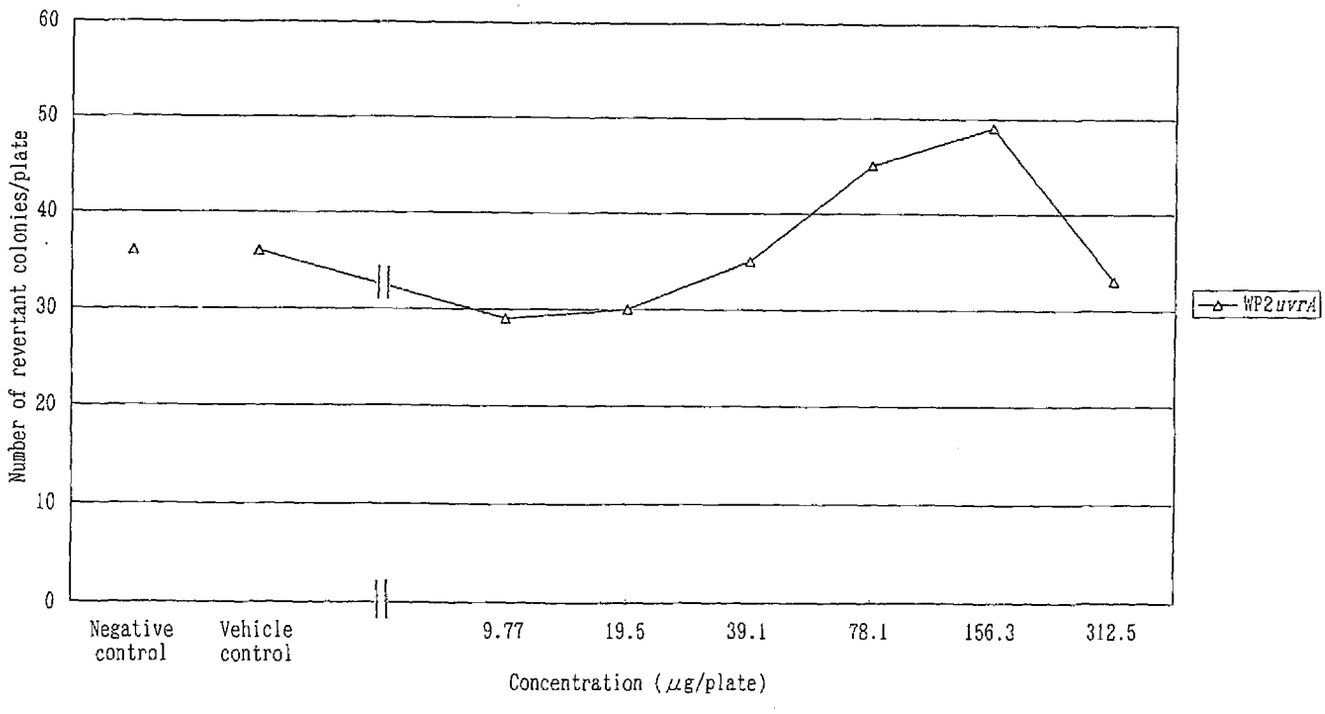

Figure 3-2. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria
(mutagenicity test II: without S9 mix)

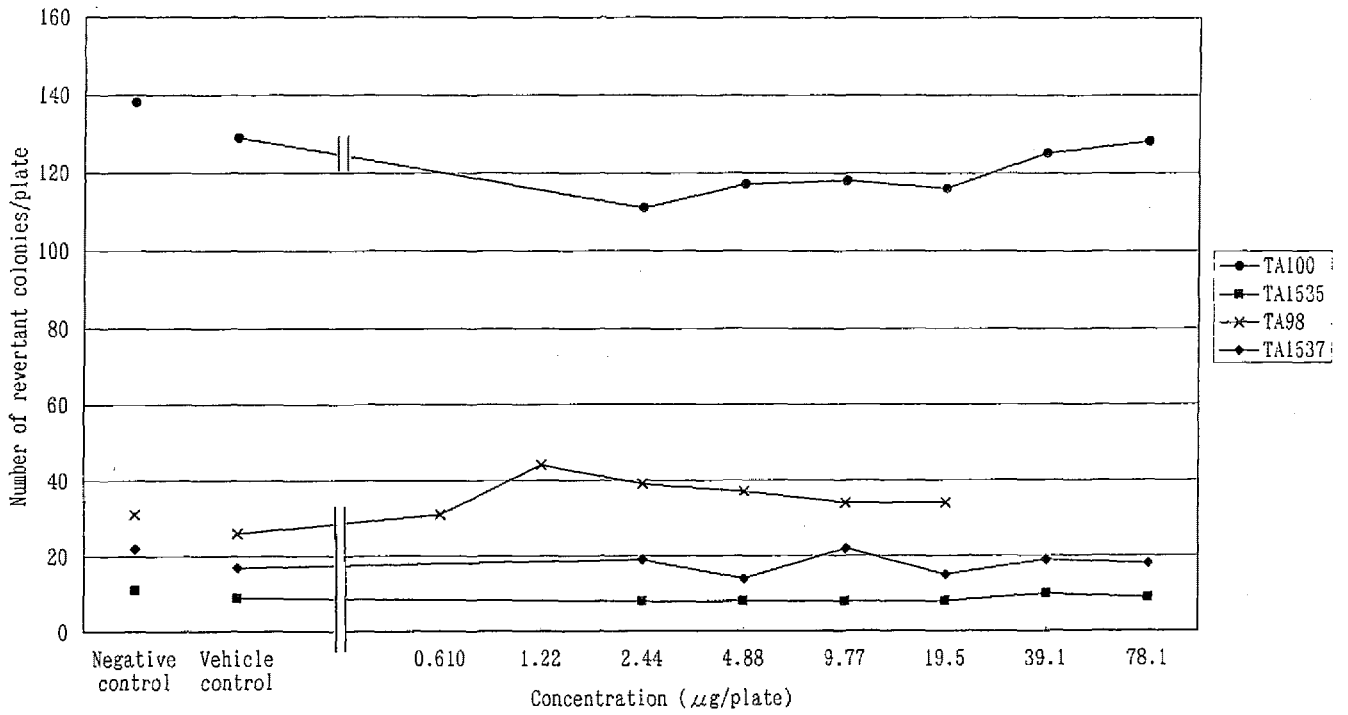

Figure 3-3. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria
(mutagenicity test II: with S9 mix)

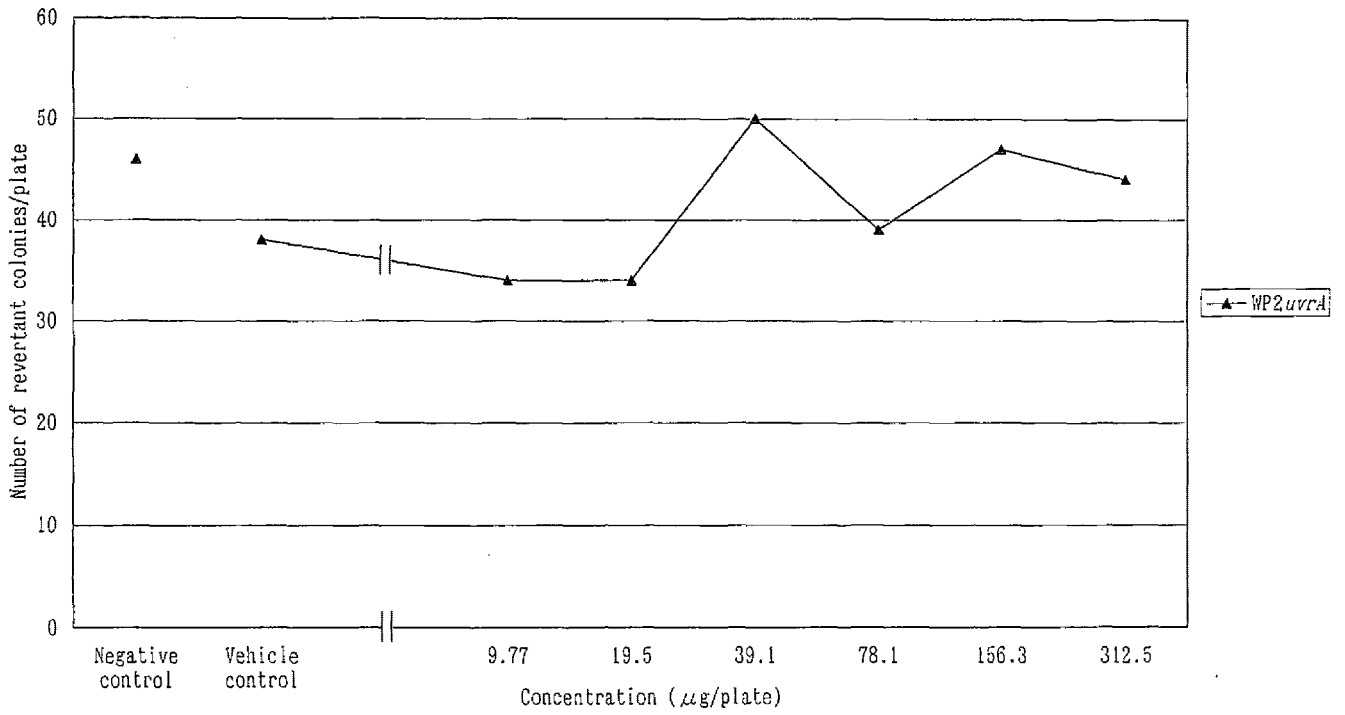

Figure 3-4. Reverse mutation test of methyl isothiocyanate in bacteria
(mutagenicity test II: with S9 mix)