

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：2482（115-041）

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目 次

1.	要 約	1 頁
2.	試 験 題 目	2
3.	試 験 目 的	2
4.	試 験 番 号	2
9.	被 験 物 質	4
10.	試験材料及び方法	5
11.	試 験 結 果	11
12.	考 察 及 び 結 論	12
13.	参 考 と し た 資 料	13

Figures 及び Tables

Figure 1	Bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride in strain TA100	15
Figure 2	Bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride in strain TA1535	16
Figure 3	Bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride in strain WP2 <i>uvrA</i>	17
Figure 4	Bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride in strain TA98	18
Figure 5	Bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride in strain TA1537	19
Table 1	Results of the bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride (1st trial) [direct method : -S9]	20
Table 2	Results of the bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride (1st trial) [activation method : +S9]	21
Table 3	Results of the bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride (2nd trial) [direct method : -S9]	22
Table 4	Results of the bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride (2nd trial) [activation method : +S9]	23

1. 要 約：

本試験条件下において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドには遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

すなわち、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの変異原性について、遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、TA98、TA1535及び TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

あらかじめ予備的な試験を実施し、本試験の用量を設定した。その結果、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理の場合 156~5,000 µg/プレート of いずれの試験用量においても、ラット肝マイクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

一方、直接法及び代謝活性化法での陽性対照物質は、すべての試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

2. 試験題目：ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの細菌を用いる
復帰突然変異試験
3. 試験目的：遺伝子突然変異誘発性を検討するため、環保業第 237号、薬発第 306
号、62基局第 303号（昭和62年3月31日）の「新規化学物質に係る試
験の方法について」及びOECD化学品テストガイドライン 471、
472（1983年）に従って、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。
なお、試験の実施は環企研第 233号、衛生第38号、63基局第 823号
（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質
に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設
について」及びOECDのGLP（1982年）の基準を満たすものとし
た。
4. 試験番号： 2482（115-041）

9. 被 験 物 質 :

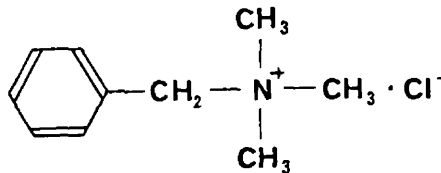
1) 被験物質名 ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド
(Benzyltrimethylammoniumchloride)

2) ロット番号

3) 純 度 99.0%以上

4) 提 供 先

5) 化学構造



6) 分 子 式 C₁₀H₁₆NCl

7) 分 子 量 185.72

8) CAS No. 56-93-9

9) 物質の状態 白色粉末

10) 融 点 239 °C

11) 被験物質保管及び 試験終了後、残りの被験物質は染色体異常試験に使用する。
残余被験物質の処理

10. 試験材料及び方法：

1) 試験菌株

次の5種類の菌株を用いた。

- | | | | |
|----|---------|-----------------|---------------------|
| a. | ネズミチフス菌 | TA100 | (ヒスチジン要求性の塩基対置換型) |
| b. | ネズミチフス菌 | TA98 | (ヒスチジン要求性のフレームシフト型) |
| c. | ネズミチフス菌 | TA1535 | (ヒスチジン要求性の塩基対置換型) |
| d. | ネズミチフス菌 | TA1537 | (ヒスチジン要求性のフレームシフト型) |
| e. | 大腸菌 | WP2 <i>uvrA</i> | (トリプトファン要求性の塩基対置換型) |

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学から、また、大腸菌は昭和58年3月16日に国立衛生試験所から分与を受けた。平成6年11月25日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液 80 容量に対し、ジメチルスルホキシド (DMSO : GC用 ; MERCK 社、独国 ; 純度99.7%以上、Lot No. 309 K18572778) 7 容量の割合で加えて混合した後、小試料チューブ (NUNC社、デンマーク) に 0.2 ml ずつ分注した。液体窒素 (LN₂) を用いて凍結した後、超低温フリーザー (MDF-390AT ; 三洋電機特機株式会社、大阪府守口市) に -80℃で保存した。

2) 培地の調製

a. 最少グルコース寒天平板培地 (プレート)

試験には日清製粉株式会社 (東京都中央区) から購入したプレート (テスメディア AN 培地) を用いた。本プレートは、下記の組成の溶液 (Vogel-Bonner最少培地 E等) をそれぞれオートクレーブ滅菌した後、 γ 線滅菌シャーレに 30 ml ずつ無菌的に分注したものである。

硫酸マグネシウム・7水塩	0.2	g
クエン酸1水塩	2	g
リン酸2カリウム・無水塩	10	g
リン酸1アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
精製水	200	ml

グルコース	20	g
精製水	100	ml

寒天 (Agar No. 1)	15	g
精製水	700	ml

ロット番号及び製造日等は、添付書類によると以下のとおりである。

- (1) 培地のロット番号： AN410IJ
- (2) 培地の製造日： 平成6年9月8日
- (3) 寒天の製造元： OXOID社、英国
- (4) 寒天のロット番号： 77083

b. トップアガー

寒天 (Bacto-agar: DIFCO 社、米国; Lot No. 12528) 0.6%を含む 0.5%塩化ナトリウム水溶液をオートクレーブ滅菌した後、室温で保存した。使用時に加温溶解し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、あらかじめメンブレンフィルター (φ 0.22 μm: 岩城硝子株式会社、東京都千代田区) を用いて濾過除菌しておいた 0.5 mM L-ヒスチジン (関東化学株式会社、東京都中央区; Lot No. 210N1018) - 0.5 mM D-ビオチン (関東化学株式会社、Lot No. 603E1730) 水溶液を 1/10容量加え、45℃に保温した。一方、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン (関東化学株式会社、Lot No. 904R6524) 水溶液を 1/10容量加え、同様に45℃に保温した。

3) 試験菌株の前培養

試験菌株の前培養には 2.5%ニュートリエントブロス (OXOID 社: No. 2; Lot No. 232 51183) 水溶液を使用した。内容量 200 ml の円筒容器に本培養液を 25 ml 分注し、これに凍結保存した菌懸濁液を融解した後、マイクロピペットを用いて 50 μl 接種した。培養開始までの間 4℃に保存し、その後ウォーターバスシェーカー (MM-10: タイテック株式会社、埼玉県越谷市) を用い、37℃で8時間振盪 (往復振盪: 120回/分) 培養した。培養終了後に光電分光光度計 (UV50-201: 株式会社日立製作所、東京都千代田区) を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試 験	生 菌 数 (×10 ⁹ /ml)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
本試験 (1回目)	4.72	5.29	5.28	4.47	2.10
本試験 (2回目)	4.91	5.52	5.56	4.64	2.23

菌懸濁液については使用時まで室温で保存した。

4) S9 mix

キッコーマン株式会社（千葉県野田市）からS9 mix (Lot No. FSM-317) を購入し、使用時まで超低温フリーザー（-80℃）に保存した。製造後6カ月以内のS9 mixを使用した。

S9のロット番号、誘導物質及び誘導方法等は、添付書類によると以下のとおりである。

a. ロット番号	RAA-317
b. 調製日	平成6年10月27日
c. 使用動物	ラット：Sprague-Dawley系
d. 性／週齢	雄／7週齢
e. 体重	188～212g
f. 誘導物質	Phenobarbital (PB) & 5,6-Benzoflavone (BF)
g. 投与量 及び回数	PB：30 mg/kg 1回（1日目）、60 mg/kg 3回（2～4日目） BF：80 mg/kg 1回（3日目）
h. 投与方法	腹腔内投与
i. 蛋白含量	26.9 mg/ml

また、S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 ml 中の量
S9	0.1 ml
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
精製水	残量

5) 被験物質溶液の調製

注射用蒸留水（大塚蒸留水：株式会社 大塚製薬工場、徳島県鳴門市；Lot No. K4G74）に被験物質を溶解させ調製原液とした。調製原液を所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。

6) 試験用量

あらかじめ1枚のプレートを用いて実施した予備的な試験の結果を以下に示す。

試験用量 (μg /プレート)	S 9 m i x	復 帰 突 然 変 異 コ ロ ニ ー 数				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
0	—	105	10	26	37	8
8.00	—	105	8	15	25	4
40.0	—	103	10	16	41	5
200	—	101	8	14	31	5
1,000	—	91	12	13	42	9
5,000	—	103*	10*	21	43	6
0	+	96	10	16	36	9
8.00	+	100	7	18	35	9
40.0	+	82	13	19	37	6
200	+	90	13	17	42	11
1,000	+	92	8	21	51	9
5,000	+	96	12	15	57	13

* : 試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。

本結果を基に、各菌株それぞれ 156~5,000 μg /プレートの計6用量(公比2)を設定した。

7) 対照試験

a. 溶媒対照

溶媒対照として、使用溶媒の注射用蒸留水 (Lot No. K4G74) を用いた。

b. 陽性対照

DMSO (Lot No. 217 K15102078) を用いて陽性対照物質を溶解し、調製後は少量ずつに分注して凍結保存 (-20℃) した。各菌株について、下記に示した用量で試験した。なお、試験用量の設定は、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—テストガイドラインとGLP」に準じた。

《直接法》	菌 株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	AF-2	0.01 µg/プレート
ネズミチフス菌	TA98	AF-2	0.1 "
ネズミチフス菌	TA1535	NaN ₃	0.5 "
ネズミチフス菌	TA1537	ACR	80.0 "
大 腸 菌	WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01 "

《代謝活性化法》	菌 株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	2-AA	1.0 µg/プレート
ネズミチフス菌	TA98	2-AA	0.5 "
ネズミチフス菌	TA1535	2-AA	2.0 "
ネズミチフス菌	TA1537	2-AA	2.0 "
大 腸 菌	WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	10.0 "

AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (和光純薬工業株式会社、大阪府大阪市；純度98.0~102.0%、Lot No. SAJ0748)

NaN₃：アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社；純度99.0%以上、Lot No. APH4078)

ACR：9-アミノアクリジン (ALDRICH 社、米国；純度98.0%、Lot No. CP01604TM)

2-AA：2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社；純度90.0%以上、Lot No. DCL3789)

c. 無菌試験

被験物質溶液 (調製原液) 及び S9 mix について無菌試験を実施した。すなわち、0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液 500 µl に調製原液 100 µl を加えたもの、あるいは 500 µl の S9 mix に、あらかじめ 45℃ で保温しておいたトッパアガー溶液 2 ml を加え、プレート上に注いだ後、軽く回転しながら一様に広げた。37℃、48時間の培養後、雑菌汚染の有無を確認した。本無菌試験は試験毎に実施し、調製原液及び S9 mix のいずれについても 1 枚のプレートを用いた。

8) 被験物質あるいは対照物質の処理及び培養時間

滅菌済み小試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μ l、次いで 0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500 μ l (直接法の場合)、あるいは S9 mix を 500 μ l (代謝活性化法の場合) を入れた。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 μ l を加え、ウォーターバスシェーカーを用い 37°C で 20 分間振盪培養 (プレインキュベーション) した。トップアガー 2 ml を加え、注意しながら混合した後、内容物をプレート上に注ぎ一様に広げた。重層した軟寒天が固化した後、プレートを上下転倒し恒温器を用いて、37°C の条件で 48 時間培養を続けた。

独立して試験を 2 回繰り返して実施した。

9) プレート数及び識別

用量当たりそれぞれ 3 枚のプレートを使用した。

油性ペンで番号等を明記することにより、各プレートを識別した。

10) コロニー数の測定

被験物質の抗菌作用を確認するため、実体顕微鏡 ($\times 60$) を用いてプレート上の試験菌株の生育阻害について調べた。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際しては自動コロニーアナライザー (CA-11; システムサイエンス株式会社、東京都福生市) を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。

11) 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ 2 倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

1 1. 試験結果：

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド調製原液ならびに S 9 mixの無菌試験において、菌の増殖（雑菌汚染）は認められなかった。

1) 本試験（1回目）

各用量における復帰突然変異コロニー数を Figure 1～5 及び Table 1～2 に示した。

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理による試験菌株に対する生育阻害作用が、直接法の TA100及び TA1535 の最高用量において観察された。

復帰突然変異コロニー数については、直接法、代謝活性化法とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。

陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。

リン酸緩衝液あるいは S 9 mix添加時、特筆すべき変化は観察されなかった。

2) 本試験（2回目）

各用量における復帰突然変異コロニー数を Figure 1～5 及び Table 3～4 に示した。

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理による生育阻害作用は、直接法の TA100及び TA1535 の最高用量においてのみ認められた。

復帰突然変異により生じたコロニー数は直接法及び代謝活性化法のいずれの試験菌株においても溶媒対照値の2倍を越えることはなかった。

陽性対照物質は各検定菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。

リン酸緩衝液あるいは S 9 mix添加時、特筆すべき変化は観察されなかった。

以上2回の試験において、直接法及び代謝活性化法の両試験とも再現性が確認された。

12. 考察及び結論：

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの変異原性、すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、微生物（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

最高用量として5,000 µg/プレートまで検討した。その結果、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理群では直接法及び代謝活性化法のいずれにおいても、復帰突然変異コロニー数が溶媒対照と同等の値を示し、増加傾向は認められなかった。

一方、陽性対照群あるいは溶媒対照群でのコロニー数はいずれも当施設での背景データの範囲内であり、本試験が有効であることを示していた。

以上の試験結果から、本試験条件下においてベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

13. 参考とした資料：

- Ames, B. N., Lee, F. D. and Durston, W. E. : An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 782 ~ 786, 1973.
- Ames, B. N. *et al.*, : Carcinogens are mutagens : A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 2, 281 ~ 2, 285, 1973.
- Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mut. Res., 31, 347 ~ 364, 1975.
- 矢作多貴江： 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について、蛋白質・核酸・酵素、20(13)、16~27, 1975.
- 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、1991.

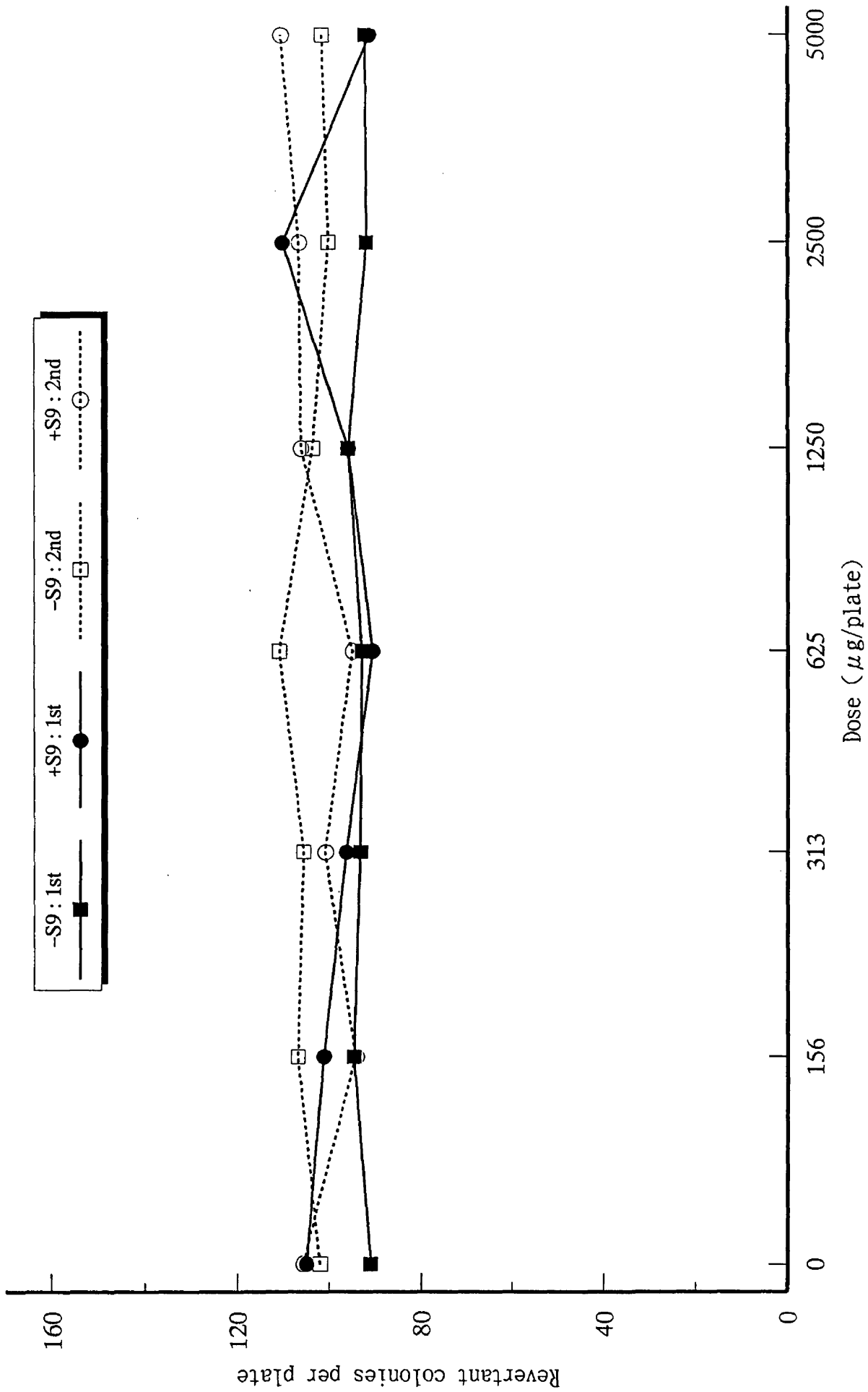


Figure 1. Bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride in strain TA100

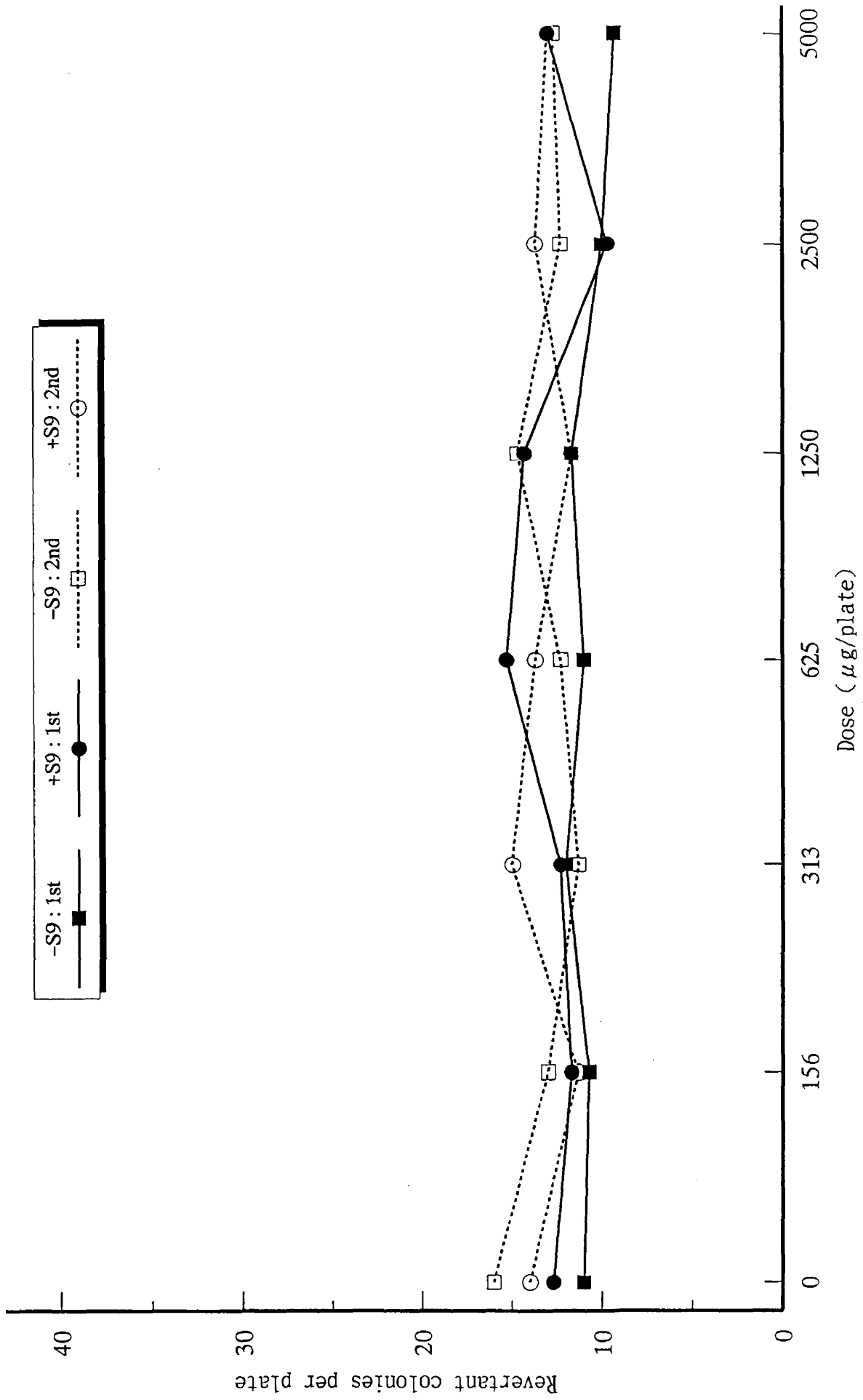


Figure 2. Bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride in strain TA1535

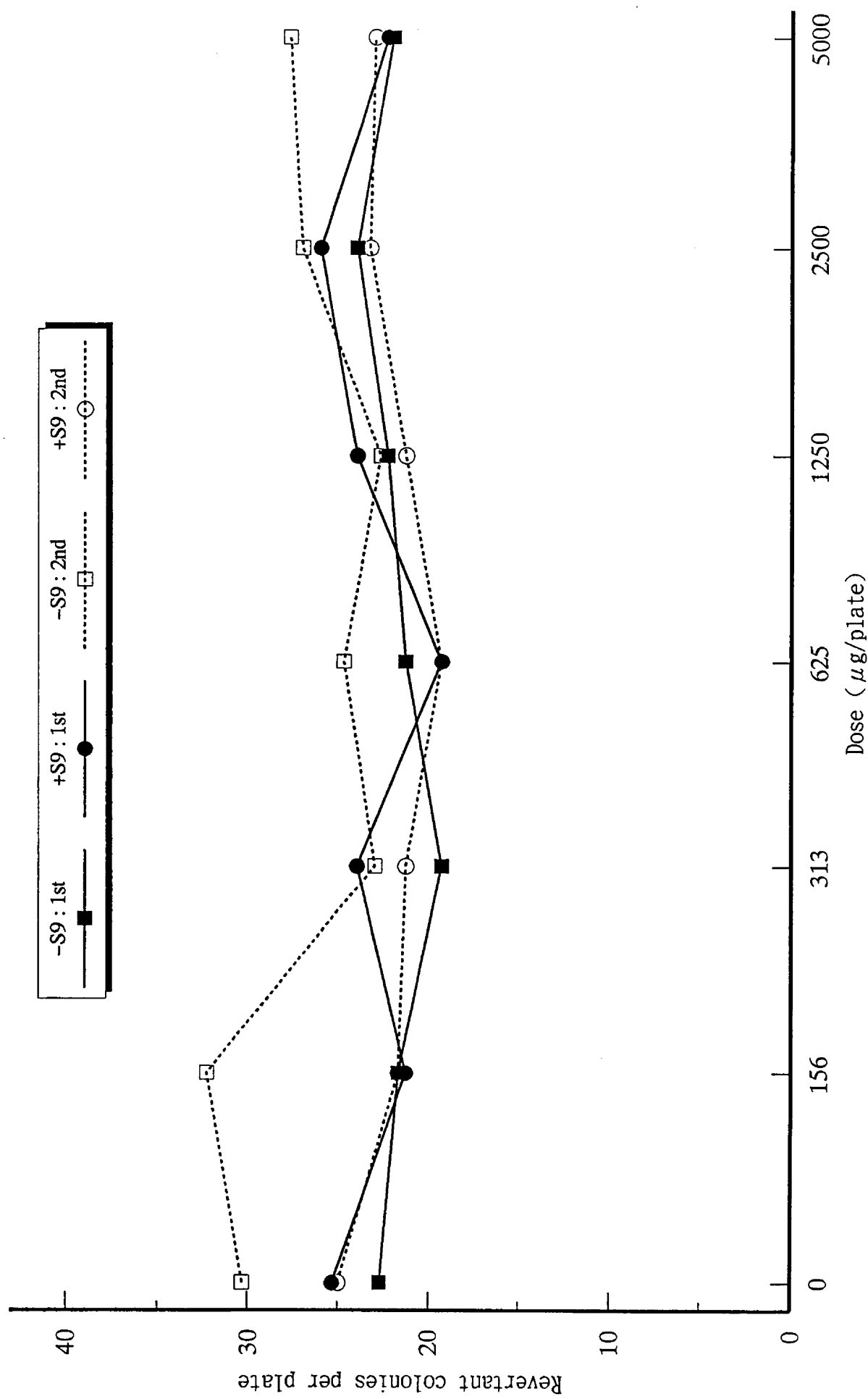


Figure 3. Bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride in strain WP2 *uvrA*

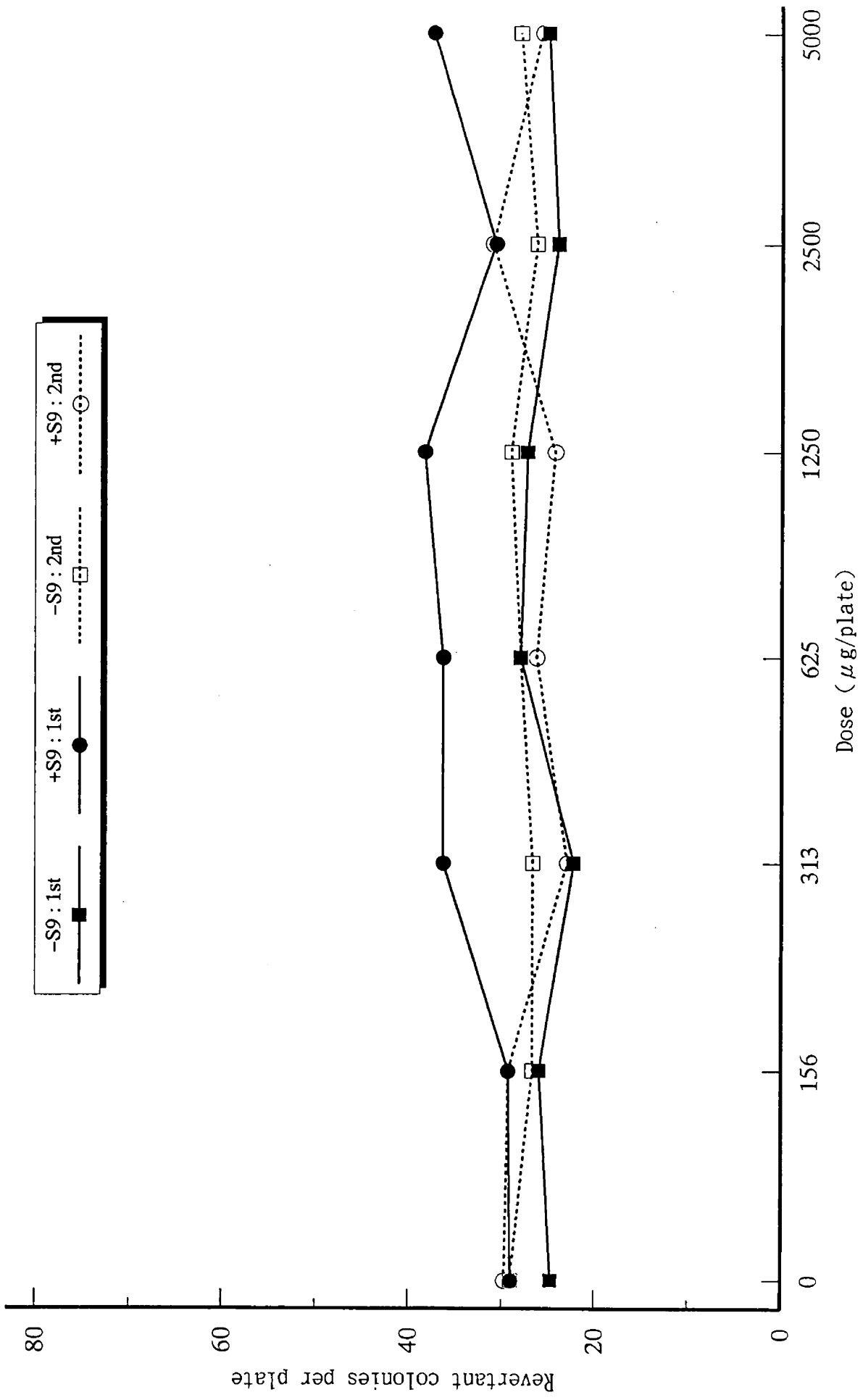


Figure 4. Bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride in strain TA98

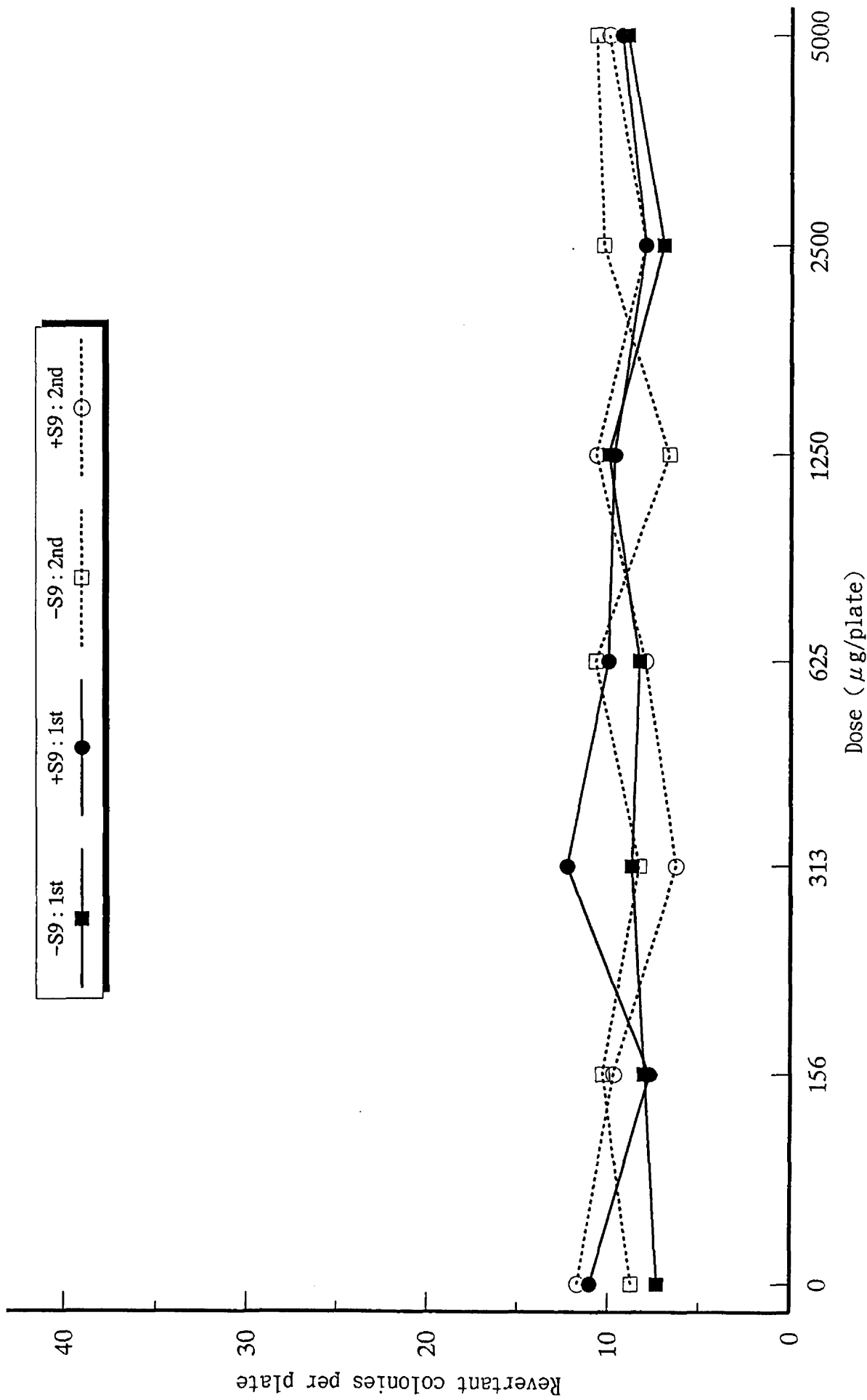


Figure 5. Bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride in strain TA1537

Table 1. Results of the bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride (1st trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2 uvra	TA98	TA1537
D. W. #	0	97 [91 \pm 6]	13 8 12 [11 \pm 3]	23 24 21 [23 \pm 2]	22 27 25 [25 \pm 3]	9 6 7 [7 \pm 2]
Test sub.	156	103 93 88 [95 \pm 8]	17 7 8 [11 \pm 6]	19 22 24 [22 \pm 3]	27 30 21 [26 \pm 5]	10 5 9 [8 \pm 3]
	313	91 95 94 [93 \pm 2]	16 10 10 [12 \pm 3]	18 22 18 [19 \pm 2]	23 21 23 [22 \pm 1]	11 5 10 [9 \pm 3]
	625	95 83 101 [93 \pm 9]	9 9 15 [11 \pm 3]	19 21 24 [21 \pm 3]	29 28 27 [28 \pm 1]	11 5 9 [8 \pm 3]
	1250	90 96 102 [96 \pm 6]	11 10 14 [12 \pm 2]	23 24 20 [22 \pm 2]	20 35 27 [27 \pm 8]	10 11 9 [10 \pm 1]
	2500	87 100 89 [92 \pm 7]	17 7 6 [10 \pm 6]	25 26 21 [24 \pm 3]	25 24 23 [24 \pm 1]	7 6 8 [7 \pm 1]
	5000	97* 84* 96* [92 \pm 7]	7* 13* 8* [9 \pm 3]	23 21 22 [22 \pm 1]	22 30 23 [25 \pm 4]	10 9 8 [9 \pm 1]
Positive control		555 518 487 ^{a)} [520 \pm 34]	464 409 411 ^{b)} [428 \pm 31]	119 126 124 ^{a)} [123 \pm 4]	631 595 660 ^{c)} [629 \pm 33]	546 496 519 ^{d)} [520 \pm 25]

: Solvent control * : Cell death was observed

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b) : NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/plate

c) : AF-2, 0.1 μ g/plate d) : ACR; 9-Aminoacridine, 80 μ g/plate

Table 2. Results of the bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride (1st trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S. D.]					
		TA100	TA1535	WP2 uvra	TA98	TA1537	
D. W. #	0	106 [105 \pm 5]	15 10 13 [13 \pm 3]	31 20 25 [25 \pm 6]	27 32 28 [29 \pm 3]	12 11 10 [11 \pm 1]	
Test sub.	156	109 93 102 [101 \pm 8]	14 9 12 [12 \pm 3]	24 21 19 [21 \pm 3]	31 25 32 [29 \pm 4]	9 7 7 [8 \pm 1]	
	313	99 96 94 [96 \pm 3]	14 10 13 [12 \pm 2]	26 20 26 [24 \pm 3]	31 43 35 [36 \pm 6]	15 11 11 [12 \pm 2]	
	625	90 93 89 [91 \pm 2]	17 13 16 [15 \pm 2]	22 19 17 [19 \pm 3]	33 33 43 [36 \pm 6]	11 10 9 [10 \pm 1]	
	1250	96 94 98 [96 \pm 2]	15 15 13 [14 \pm 1]	23 23 26 [24 \pm 2]	34 47 34 [38 \pm 8]	14 6 9 [10 \pm 4]	
	2500	103 116 112 [110 \pm 7]	8 13 8 [10 \pm 3]	31 26 21 [26 \pm 5]	31 29 32 [31 \pm 2]	6 10 8 [8 \pm 2]	
	5000	95 86 93 [91 \pm 5]	18 14 7 [13 \pm 6]	23 21 23 [22 \pm 1]	47 35 30 [37 \pm 9]	12 5 11 [9 \pm 4]	
Positive control		668 655 682 ^{a)} [668 \pm 14]	319 333 376 ^{b)} [343 \pm 30]	792 700 762 ^{c)} [751 \pm 47]	391 335 316 ^{d)} [347 \pm 39]	152 133 171 ^{b)} [152 \pm 19]	

: Solvent control

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate b) : 2-AA, 2 μ g/plate c) : 2-AA, 10 μ g/plate d) : 2-AA, 0.5 μ g/plate

Table 3. Results of the bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S. D.]					
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
D. W. #	0	116 [102 \pm 12]	17 16 15 [16 \pm 1]	29 33 29 [30 \pm 2]	32 29 26 [29 \pm 3]	7 11 8 [9 \pm 2]	
Test sub.	156	105 105 111 [107 \pm 3]	14 15 10 [13 \pm 3]	37 35 25 [32 \pm 6]	27 32 21 [27 \pm 6]	10 12 9 [10 \pm 2]	
	313	115 103 99 [106 \pm 8]	17 9 8 [11 \pm 5]	24 21 24 [23 \pm 2]	30 20 30 [27 \pm 6]	9 8 8 [8 \pm 1]	
	625	110 99 124 [111 \pm 13]	14 14 9 [12 \pm 3]	25 22 27 [25 \pm 3]	30 23 31 [28 \pm 4]	12 11 9 [11 \pm 2]	
	1250	110 99 102 [104 \pm 6]	18 12 14 [15 \pm 3]	23 24 21 [23 \pm 2]	35 27 25 [29 \pm 5]	4 9 7 [7 \pm 3]	
	2500	94 109 98 [100 \pm 8]	13 13 11 [12 \pm 1]	26 25 30 [27 \pm 3]	25 26 28 [26 \pm 2]	12 10 9 [10 \pm 2]	
	5000	91* 110* 104* [102 \pm 10]	12* 13* 13* [13 \pm 1]	29 26 28 [28 \pm 2]	25 27 32 [28 \pm 4]	11 11 10 [11 \pm 1]	
Positive control		441 437 458 ^{a)} [445 \pm 11]	507 436 439 ^{b)} [461 \pm 40]	122 111 121 ^{a)} [118 \pm 6]	501 570 543 ^{c)} [538 \pm 35]	450 482 448 ^{d)} [460 \pm 19]	

: Solvent control * : Cell death was observed

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b) : NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/platec) : AF-2, 0.1 μ g/plate d) : ACR; 9-Aminoacridine, 80 μ g/plate

Table 4. Results of the bacterial reversion test of Benzyltrimethylammoniumchloride (2nd trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2 uvra	TA98	TA1537
D. W. #	0	111 [106 \pm 12]	12 15 15 [14 \pm 2]	28 21 26 [25 \pm 4]	30 34 25 [30 \pm 5]	15 9 11 [12 \pm 3]
Test sub.	156	84 101 98 [94 \pm 9]	9 9 16 [11 \pm 4]	24 19 22 [22 \pm 3]	34 26 28 [29 \pm 4]	10 10 9 [10 \pm 1]
	313	82 101 120 [101 \pm 19]	13 16 16 [15 \pm 2]	23 22 19 [21 \pm 2]	27 18 24 [23 \pm 5]	5 6 8 [6 \pm 2]
	625	116 84 85 [95 \pm 18]	15 10 16 [14 \pm 3]	20 14 24 [19 \pm 5]	21 30 28 [26 \pm 5]	7 7 10 [8 \pm 2]
	1250	114 109 96 [106 \pm 9]	14 11 10 [12 \pm 2]	20 20 24 [21 \pm 2]	28 26 19 [24 \pm 5]	8 11 13 [11 \pm 3]
	2500	115 103 102 [107 \pm 7]	10 16 15 [14 \pm 3]	25 19 26 [23 \pm 4]	39 25 29 [31 \pm 7]	9 9 6 [8 \pm 2]
	5000	104 118 110 [111 \pm 7]	16 13 10 [13 \pm 3]	27 22 20 [23 \pm 4]	25 26 26 [26 \pm 1]	10 13 7 [10 \pm 3]
Positive control	614 625 618 ^{a)} [619 \pm 6]	415 382 384 ^{b)} [394 \pm 19]	795 730 745 ^{c)} [757 \pm 34]	308 311 346 ^{d)} [322 \pm 21]	103 113 135 ^{b)} [117 \pm 16]	

: Solvent control

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate b): 2-AA, 2 μ g/plate c): 2-AA, 10 μ g/plate d): 2-AA, 0.5 μ g/plate