



フマル酸ジエチル
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
材料および試験方法	3
試験結果および考察	6
参 考 文 献	8
Tables 1～4	

【要 約】

フマル酸ジエチル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 *uvr* A を用い、用量設定試験では直接法および代謝活性化法のいずれも、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で、本試験の直接法では、TA100 は 9.375～300 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1535, TA98 および TA1537 は 78.13～2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、さらに WP2では 156.3～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で、また代謝活性化法ではすべての検定菌で 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、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、フマル酸ジエチルは、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、フマル酸ジエチルについて、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⁽¹⁾、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⁽²⁾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 *uvr* A
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 *uvr*A 株は1979年 5 月 9 日に

から分与

を受けた。

検定菌は、 -80°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°C 、約11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〕

フマル酸ジエチル (CAS No 623-91-6、以下DEFと略) は、分子量 172 の無色透明、比重 ($20^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$) 1.055 の液体である。純度 93.3%のもの (不純物としてマレイン酸ジエチル 4.9%、その他 1.8%を含む、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。

DEF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 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DEFのアセトン溶液中での安定性試験を行った。本試験における最高濃度 (50 mg/ml) および最低濃度 ($90\text{ }\mu\text{g/ml}$) 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、108 および 99.1%であった。これらの値は、当研究所の基準を満たしていた (Appendix 1)。

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、 50 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、101~109%、 $93.75\text{ }\mu\text{g/ml}$ 溶液は、108~109%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 2)。

以上の結果から、D E F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°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7ガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピオニン	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、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7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 (pH 7.4)	0.5 ml
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-280、1992年7月24日製造および 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 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ある。ラットの解剖および S9 の調製は5日目に行った。

[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。

小試験管中にトップアガー 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。用量設定試験は追加試験を含めて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。DEFについて、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で、公比約 3 とし、試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において、高用量で抗菌性が認められた。抗菌性は TA100 の直接法において最も強く認められ、500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量でも認められた。その他の検定菌においては、TA1535 と TA98 の直接法および TA100 の代謝活性化法では 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量まで、それ以外は 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で抗菌性が認められた。抗菌性について、追加試験を行ったところ、TA100 の直接法においては、625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量まで抗菌性が認められたが、WP2 の直接法では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA100 の代謝活性化法では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量でも抗菌性は認められなかった。

以上の結果から、本試験における最高用量を直接法においては、TA100 では 300 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1535、TA98 および TA1537 については 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、さらに WP2 については 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比 2 で 6 用量を、代謝活性化法においてはすべての検定菌で 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比 2 で 5 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。DEF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、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。TA1535 および WP2 の代謝活性化法以外の試験においては、最高用量において、抗菌性が認められた。

DEF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、DEF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 Diethyl fumarate

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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9 Mix	0	110	132	127	15	9	13	12	12	14	22	21	20	5	7	7	
		(123 \pm 11.5)			(12 \pm 3.1)			(13 \pm 1.2)			(21 \pm 1.0)			(6 \pm 1.2)			
	50	103			13			14			22			6			
	150	109			8			20			18			6			
	500	91 *			11			13			23			4			
	1500	71 *			5 *			9			7 *			4			
	5000	0 *			0 *			1 *			0 *			0 *			
S9 Mix (+)	0	126	107	135	12	15	6	22	16	22	21	25	24	12	14	11	
		(123 \pm 14.3)			(11 \pm 4.6)			(20 \pm 3.5)			(23 \pm 2.1)			(12 \pm 1.5)			
	50	134			11			20			18			16			
	150	108			15			18			29			15			
	500	133			10			19			22			13			
	1500	98 *			10			24			33			16			
	5000	90 *			11 *			18 *			20 *			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	481	424	456	277	228	191	421	425	422	240	202	208	151	174	194	
		(454 \pm 28.6)			(232 \pm 43.1)			(423 \pm 2.1)			(217 \pm 20.4)			(173 \pm 21.5)			

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.

Table 2. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with Diethyl fumarate

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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9 Mix (-)	0	136	127	105	15	13	14	28	21	21	15	16	13	15	13	10	
		(123 \pm 15.9)			(14 \pm 1.0)			(23 \pm 4.0)			(15 \pm 1.5)			(13 \pm 2.5)			
	312.5	95															
	625	88 *															
	1250	61 *			11 *			5			14			1			
	2500				0 *			5			0 *			0 *			
S9 Mix (+)	0	127	128	124													
		(126 \pm 2.1)															
	1250	134															
	2500	135															
	5000	128															
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
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	476	496	480	258	230	254	144	168	137	566	618	584	2654	2431	2299	
		(484 \pm 10.6)			(247 \pm 15.1)			(150 \pm 16.3)			(589 \pm 26.4)			(2461 \pm 179.4)			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	614	648	632													
		(631 \pm 17.0)															

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.

Table 3-1. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with Diethyl fumarate

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			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0		9	17	10	13	13	20	14	21	11	6	7	7		
			(12 \pm 4.4)			(15 \pm 4.0)			(15 \pm 5.1)			(7 \pm 0.6)				
	78.13		14	16	11				20	15	12	8	5	8		
			(14 \pm 2.5)						(16 \pm 4.0)			(7 \pm 1.7)				
	156.3		16	13	14	27	19	12	12	25	19	5	7	6		
			(14 \pm 1.5)			(19 \pm 7.5)			(19 \pm 6.5)			(6 \pm 1.0)				
	312.5		9	25	12	24	16	30	19	11	24	8	8	5		
			(15 \pm 8.5)			(23 \pm 7.0)			(18 \pm 6.6)			(7 \pm 1.7)				
S9Mix (+)	625		8	14	9	20	8	12	19	18	14	5	4	5		
			(10 \pm 3.2)			(13 \pm 6.1)			(17 \pm 2.6)			(5 \pm 0.6)				
	1250		7	7	8	13	20	16	18	19	10	9	3	7		
			(7 \pm 0.6)			(16 \pm 3.5)			(16 \pm 4.9)			(6 \pm 3.1)				
S9Mix (+)	2500		1*	0*	1*	2*	2*	3*	3*	14*	3*	1*	6*	7*		
			(1 \pm 0.6)			(2 \pm 0.6)			(7 \pm 6.4)			(5 \pm 3.2)				
S9Mix (+)	5000					0*	0*	0*								
						(0 \pm 0.0)										
S9Mix (-)	0	162	135	166	20	8	7	25	13	20	41	23	31	14	10	5
		(154 \pm 16.9)			(12 \pm 7.2)			(19 \pm 6.0)			(32 \pm 9.0)			(10 \pm 4.5)		
	312.5	130	146	159	21	12	16	21	19	25	34	37	36	12	15	6
		(145 \pm 14.5)			(16 \pm 4.5)			(22 \pm 3.1)			(36 \pm 1.5)			(11 \pm 4.6)		
	625	159	166	134	23	18	15	23	25	20	46	29	40	17	16	12
		(153 \pm 16.8)			(19 \pm 4.0)			(23 \pm 2.5)			(38 \pm 8.6)			(15 \pm 2.6)		
S9Mix (+)	1250	143	118	142	17	17	12	13	23	16	32	42	35	7	11	14
		(134 \pm 14.2)			(15 \pm 2.9)			(17 \pm 5.1)			(36 \pm 5.1)			(11 \pm 3.5)		
	2500	118	111	139	13	14	6	26	14	14	29	20	33	12	14	3
		(123 \pm 14.6)			(11 \pm 4.4)			(18 \pm 6.9)			(27 \pm 6.7)			(10 \pm 5.9)		
S9Mix (+)	5000	83*	94*	88*	11	5	4	22	24	17	26	15	20	4	9	12
		(88 \pm 5.5)			(7 \pm 3.8)			(21 \pm 3.6)			(20 \pm 5.5)			(8 \pm 4.0)		
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate		152	185	154	232	251	211	620	647	672	2837	2633	2595		
			(164 \pm 18.5)			(231 \pm 20.0)			(646 \pm 26.0)			(2688 \pm 130.1)				
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	615	667	602	154	151	165	749	773	721	195	181	143	146	179	190
		(628 \pm 34.4)			(157 \pm 7.4)			(748 \pm 26.0)			(173 \pm 26.9)			(172 \pm 22.9)		

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.

Table 3-2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with Diethyl fumarate

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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix	0	113 119 133 (122 \pm 10.3)					
	9.375	135 132 156 (141 \pm 13.1)					
	18.75	136 133 146 (138 \pm 6.8)					
	37.5	121 150 130 (134 \pm 14.8)					
	75	137 121 130 (129 \pm 8.0)					
	150	114 149 165 (143 \pm 26.1)					
	300	113 * 129 * 119 * (120 \pm 8.1)					
S9Mix (+)							
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	646 612 613 (624 \pm 19.3)					
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate						

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.

Table 4-1. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with Diethyl fumarate

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			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0		16	21	16	19	17	24	28	21	37	10	6	11		
			(18 \pm 2.9)			(20 \pm 3.6)			(29 \pm 8.0)			(9 \pm 2.6)				
	78.13		9	13	17				30	17	18	9	4	9		
			(13 \pm 4.0)						(22 \pm 7.2)			(7 \pm 2.9)				
	156.3		16	11	18	19	27	18	28	28	35	6	7	6		
			(15 \pm 3.6)			(21 \pm 4.9)			(30 \pm 4.0)			(6 \pm 0.6)				
	312.5		9	21	12	9	10	20	15	28	29	8	10	5		
			(14 \pm 6.2)			(13 \pm 6.1)			(24 \pm 7.8)			(8 \pm 2.5)				
625		17	9	9	18	16	15	33	33	18	9	4	10			
		(12 \pm 4.6)			(16 \pm 1.5)			(28 \pm 8.7)			(8 \pm 3.2)					
1250		13	16	16	13	14	5	22	20	20	5	2	5			
		(15 \pm 1.7)			(11 \pm 4.9)			(21 \pm 1.2)			(4 \pm 1.7)					
2500		2 *	2 *	1 *	9	7	11	11 *	8 *	10 *	2 *	2 *	2 *			
		(2 \pm 0.6)			(9 \pm 2.0)			(10 \pm 1.5)			(2 \pm 0.0)					
5000					0 *	0 *	3 *									
					(1 \pm 1.7)											
S9Mix (+)	0	135	147	177	16	22	13	17	13	21	48	47	52	7	13	18
		(153 \pm 21.6)			(17 \pm 4.6)			(17 \pm 4.0)			(49 \pm 2.6)			(13 \pm 5.5)		
	312.5	178	176	172	23	19	23	32	29	24	48	36	44	17	22	17
		(175 \pm 3.1)			(22 \pm 2.3)			(28 \pm 4.0)			(43 \pm 6.1)			(19 \pm 2.9)		
	625	174	174	159	19	15	9	23	27	30	34	41	46	27	17	23
		(169 \pm 8.7)			(14 \pm 5.0)			(27 \pm 3.5)			(40 \pm 6.0)			(22 \pm 5.0)		
1250	138	165	137	14	18	18	26	24	23	44	36	41	9	14	15	
	(147 \pm 15.9)			(17 \pm 2.3)			(24 \pm 1.5)			(40 \pm 4.0)			(13 \pm 3.2)			
2500	143	130	151	20	13	21	22	16	21	29	32	31	17	9	18	
	(135 \pm 7.2)			(18 \pm 4.4)			(20 \pm 3.2)			(31 \pm 1.5)			(15 \pm 4.9)			
5000	103 *	102 *	115 *	7	11	8	24	15	21	23 *	25 *	20 *	11 *	10 *	14 *	
	(107 \pm 7.2)			(9 \pm 2.1)			(20 \pm 4.6)			(23 \pm 2.5)			(12 \pm 2.1)			
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	889	769	794	283	239	280	676	518	615	321	361	366	209	188	199
		(817 \pm 63.3)			(267 \pm 24.6)			(603 \pm 79.7)			(349 \pm 24.7)			(199 \pm 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.

Table 4-2. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with Diethyl fumarate

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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 Mix (-)	0	135 138 123 (132 \pm 7.9)					
	9.375	156 161 139 (152 \pm 11.5)					
	18.75	183 151 136 (157 \pm 24.0)					
	37.5	142 130 156 (143 \pm 13.0)					
	75	131 147 148 (142 \pm 9.5)					
	150	145 162 123 (143 \pm 19.6)					
	300	106 * 120 * 115 * (114 \pm 7.1)					
S9 Mix ()							
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	586 617 614 (606 \pm 17.1)					
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate						

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.