3，4－ジクロロ－1－ブテンの
細菌を用いる
復帰突然変異試験

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　　1～5

【要　　約】

3,4-ジクロロ-1-ブテン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 *uvr*A の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレート法により用量設定試験および本試験を行った。用量設定試験を 50～5000 μg/プレート の用量で行ったところ、S9 mix 無添加試験で WP2 *uvr*A と TA1537 の 1500 μg/プレート 以上、その他の3菌株では 5000 μg/プレート で、また S9 mix 添加試験では TA1535、WP2 *uvr*A 、TA1537 で 1500 μg/プレート 以上、他の2菌株では 5000 μg/プレート の用量で抗菌性が認められた。また TA100 および TA1535 については S9 mix 無添加、添加のいずれの試験においても、変異コロニー数が増加する傾向にあった。そこで、本試験での最高用量を S9 mix 無添加、添加のいずれの条件についても 2500 μg/プレート（S9 mix 添加の TA100 および TA98 のみそれぞれ 3000 μg/プレート および 5000 μg/プレート）とし、TA100 と TA1535 の2菌株は等差で、その他の3菌株は公比2で用量を設定した。しかし1回目の本試験において用量設定試験よりもさらに低い濃度において抗菌性が認められた菌株が多かったため、最高用量をさらに1～2段階低くして、いずれの菌株においても再現性の確認ができるまで試験を行った。

その結果、用いた5種類の検定菌のうち TA1535 の S9 mix 無添加、添加試験のいずれも溶媒対照値の2倍以上となる用量依存性のある復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性も確認されたことから、3,4-ジクロロ-1-ブテンは、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】

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、3,4-ジクロロ-1-ブテンについて、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突然変異[(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突然変異[(2)]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 *uvr*A
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 *uvr*A 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pKM101（プラスミド）の有無について行った。

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〕

3,4-ジクロロ-1-ブテン（DB、CAS No. 760-23-6）は、分子量 124.99 の無色透明（購入時は淡黄色）の液体である。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%（不純物：不明）のものを購入した。被験物質は、使用時まで冷蔵保管した。

ＤＢは、アセトン（ロット番号：DSM4173 および KCL7177、和光純薬工業㈱）に 50 mg/mℓ となるよう溶解した後、同溶媒で公比約３ないし２、あるいは等差で希釈し、速やかに試験に用いた。

ＤＢのアセトン溶液中での安定性試験および含量測定試験を秦野研究所において実施した。安定性試験においては、低濃度（0.500 mg/mℓ）溶液は当研究所で実施した染色体異常試験(G-94-021）で調製したものについて、また高濃度（50.0 mg/mℓ）溶液は当該試験の本試験Ｉで調製したものについて、室温遮光条件下で、調製後４時間までの安定性を調べた。その結果、調製４時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値（０時間）

の平均値に対して、105 および 100%であった。これらの値は当研究所で規定している基準内（4時間後における平均含有量が初期値の90%以上）であった（Appendix 2、3)。

また、本試験Ⅰで調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、いずれも当研究所の規定している基準内（溶媒中での平均含量が添加量の90～110%）であった（Appendix 4）。

〔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)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	(上野製薬㈱	ﾛｯﾄ番号 46,	純度99.9%)
SA	: ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度90%以上)
9AA	: 9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	(Sigma Chem. Co.	ﾛｯﾄ番号 96F05641,	純度98%以上)
2AA	: 2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 DSF2950,	純度90%以上)

AF2, 2AA は DMSO（和光純薬工業㈱）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) ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco)	0.6%	(B)* L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5%	ﾋﾞｵﾁﾝ	0.5 mM

* : WP2 *uvr*A 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

1）合成培地

培地は、日清製粉㈱製の最少寒天培地（ロット番号：DJ030HJ、1994年8月11日製造および DJ040KJ、1994年11月21日製造、DJ010BK、1995年2月6日製造）を用いた。なお、培地1ℓあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ・7水和物	0.2g	水酸化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.66g
ｸｴﾝ酸・1水和物	2g	ｸﾞﾙｺｰｽ	20g

ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10 g	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (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（１mℓ中下記の成分を含む）

S9**	0.1 mℓ	NADH	4 μmol
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化ｶﾘｳﾑ	33 μmol	ﾅﾄﾘｳﾑ-ﾘﾝ酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
ｸﾞﾙｺｰｽ-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㈱、ロット番号 RAA-309、1994年５月13日製造および RAA-317、同年10月27日製造、RAA-321、1995年１月20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〕

プレート法により、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、トップアガー２mℓ、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。培養は37℃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２回実施し、さらに再現性試験を行い結果の再現性を確認した。

〔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。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。ＤＢについて 50～5000 μg/プレート の範囲で公比を約 3 として、試験を実施したところ、S9 mix 無添加試験では WP2 *uvr*A、TA1537 において 1500 μg/プレート 以上で、その他は 5000 μg/プレート で、また S9 mix 添加試験では TA1535、WP2 *uvr*A、TA1537 において 1500 μg/プレート 以上で、他の 2 菌株では 5000 μg/プレート で抗菌性が認められた。

なお、TA100 および TA1535 では S9 mix の添加にかかわりなく、変異コロニー数の増加が認められたため、TA100 の S9 mix 添加試験は 3000 μg/プレート、その他は 2500 μg/プレート を最高用量とし等差で用量を設定することとした。その他の 3 菌株の本試験における最高用量は S9 mix 無添加試験、添加試験のいずれも 2500 μg/プレート（TA98 の S9 mix 添加試験のみ 5000 μg/プレート）とした。

〔本試験および再現性試験〕

本試験Ｉの結果を Table 2-1、2-2 に示した。TA1535 の S9 mix 添加試験で 1000 μg/プレート 以上の用量で溶媒対照値の 2 倍以上の変異コロニー数が認められた。TA100 の S9 mix 添加試験では、変異コロニー数の増加が認められたものの、溶媒対照値の 2 倍に満たなかったため、さらに用量の間隔を狭めて本試験Ⅱを実施することとした。また TA1535 についても TA100 と同一の用量で S9 mix 添加試験のみ最高用量を 1 用量低くすることとした。TA1537 の S9 mix 無添加試験では変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、S9 mix 無添加試験では TA1537 を除く 4 菌株で、S9 mix 添加試験では TA100、TA1535 を除く 3 菌株で抗菌性を示さない用量が 4 用量に満なかったため、それぞれ最高用量を低くして本試験Ⅱおよび再現性試験を行うこととした。

本試験Ⅱの各検定菌の用量および結果を Table 3-1、3-2 に示した。TA100 の S9 mix 無添加試験および TA1535 の S9 mix 無添加、添加の両試験で溶媒対照値の 2 倍以上の変異コロニー数が認められた。TA100 の S9 mix 添加試験では変異コロニー数の増加が認められたものの本試験Ｉと同様、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。WP2 *uvr*A、TA98、TA1537 は S9 mix 無添加、添加のいずれの試験も

用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。

再現性試験は S9 mix 無添加試験では TA100、TA1535、WP2 *uvr*A、TA98 について、S9 mix 添加試験では、WP2 *uvr*A、TA98、TA1537 について本試験Ⅱと同一用量で行った。その結果、TA1535 は溶媒対照値の 2 倍以上となる用量依存性のある変異コロニー数の増加が認められたが、その他は溶媒対照値の 2 倍以上の変異コロニー数の増加は認められなかった（Table 4-1、4-2）。TA100 については、変異コロニー数の増加は認められたものの溶媒対照値の 2 倍に満たなかったことから、さらに同一用量で再現性の確認を行い、変異コロニー数が溶媒対照値の 2 倍とならないことを確認した（Table 5)。

TA1535 の最大比活性は S9 mix 無添加試験では 62.5、S9 mix 添加試験では 25.0 であった（Appendix 5)。

ＤＢ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、3,4-ジクロロ-1-ブテンは、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) 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 reverse mutation test of 3,4-dichloro-1-butene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mea± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	105 135 133 (124± 16.8)	15 11 9 (12± 3.1)	23 21 19 (21± 2.0)	27 34 37 (33± 5.1)	9 8 10 (9± 1.0)	
	50	135	11	17	14	6	
	150	138	7	12	8	8	
	500	180	31	17	24	6	
	1500	360	69	17 *	45	10 *	
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	4 *	
S9mix (+)	0	125 106 112 (114± 9.7)	9 8 11 (9± 1.5)	27 16 25 (23± 5.9)	34 34 34 (34± 0.0)	7 14 7 (9± 4.0)	
	50	128	16	29	37	14	
	150	154	15	21	41	10	
	500	150	18	12	38	9	
	1500	219	34 *	8 *	30	6 *	
	5000	389 *	91 *	6 *	17 *	9 *	
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	574 592 587 (584± 9.3)	340 411 372 (374± 35.6)	139 153 125 (139± 14.0)	816 841 931 (863± 60.5)	1166 1218 1272 (1219± 53.0)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	1154 1249 1225 (1209± 49.4)	186 200 230 (205± 22.5)	823 998 989 (937± 98.5)	489 486 501 (492± 7.9)	325 339 362 (342± 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% and impurity was unknown.

Table 2-1. Results of reverse mutation test (I) of 3,4-dichloro-1-butene ** 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					
		TA100	TA1535				
S9mix (-)	0	127 126 120 (124 ± 3.8)	20 15 13 (16 ± 3.6)				
	500	183 206 190 (193 ± 11.8)	26 21 11 (19 ± 7.6)				
	1000	110 * 128 * 98 * (112 ± 15.1)	22 * 19 * 13 * (18 ± 4.6)				
	1500	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	20 * 12 * 16 * (16 ± 4.0)				
	2000	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	18 * 0 * 0 * (6 ± 10.4)				
	2500	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)				
S9mix (+)	0	158 149 168 (158 ± 9.5)	23 24 11 (19 ± 7.2)				
	500	ND	28 29 25 (27 ± 2.1)				
	1000	196 174 200 (190 ± 14.0)	47 41 44 (44 ± 3.0)				
	1500	239 231 205 (225 ± 17.8)	45 53 41 (46 ± 6.1)				
	2000	213 245 237 (232 ± 16.7)	75 52 63 (63 ± 11.5)				
	2500	243 220 226 (230 ± 11.9)	66 * 66 * 74 * (69 ± 4.6)				
	3000	290 * 275 * 313 * (293 ± 19.1)					
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA				
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5				
	Number of colonies / plate	868 803 830 (834 ± 32.7)	170 165 175 (170 ± 5.0)				
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA				
	Dose (μg /plate)	1	2				
	Number of colonies / plate	1352 1209 1238 (1266 ± 75.6)	270 316 300 (295 ± 23.4)				

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 2-2. Results of reverse mutation test (I) of 3,4-dichloro-1-butene ** 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		
				WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0			16 23 23 (21 ± 4.0)	25 34 21 (27 ± 6.7)	6 8 8 (7 ± 1.2)	
	156			24 33 22 (26 ± 5.9)	19 30 17 (22 ± 7.0)	5 7 4 (5 ± 1.5)	
	313			30 24 27 (27 ± 3.0)	30 17 22 (23 ± 6.6)	9 4 5 (6 ± 2.6)	
	625			28 17 30 (25 ± 7.0)	14 * 15 * 17 * (15 ± 1.5)	6 6 8 (7 ± 1.2)	
	1250			27 27 18 * (24 ± 5.2)	0 * 0 * 20 * (7 ± 11.5)	6 7 3 (5 ± 2.1)	
	2500			0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
S9mix (+)	0			28 24 21 (24 ± 3.5)	37 30 24 (30 ± 6.5)	29 14 20 (21 ± 7.5)	
	156			27 35 32 (31 ± 4.0)	ND	6 12 13 (10 ± 3.8)	
	313			31 38 26 (32 ± 6.0)	31 43 41 (38 ± 6.4)	13 10 13 (12 ± 1.7)	
	625			26 25 32 (28 ± 3.8)	25 33 27 (28 ± 4.2)	13 3 12 (9 ± 5.5)	
	1250			24 * 0 * 0 * (8 ± 13.9)	4 * 0 * 0 * (1 ± 2.3)	5 * 0 * 0 * (2 ± 2.9)	
	2500			0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
	5000				0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)		
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)			0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate			146 162 170 (159 ± 12.2)	894 873 913 (893 ± 20.0)	1310 1187 1149 (1215 ± 84.2)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)			10	0.5	2	
	Number of colonies / plate			1214 1213 1269 (1232 ± 32.0)	420 373 374 (389 ± 26.9)	243 212 142 (199 ± 51.7)	

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 3-1. Results of reverse mutation test (II) of 3,4-dichloro-1-butene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Me± S.D.)					
		Base - pair substitution type					
		TA100	TA1535				
S9mix (-)	0	137 126 185 (149 ± 31.4)	22 10 12 (15 ± 6.4)				
	250	364 397 384 (382 ± 16.6)	19 34 32 (28 ± 8.1)				
	400	464 314 326 (368 ± 83.4)	38 40 41 (40 ± 1.5)				
	550	304 309 306 (306 ± 2.5)	38 36 38 (37 ± 1.2)				
	700	339 493 469 (434 ± 82.9)	29 30 26 (28 ± 2.1)				
	850	269 * 311 * 139 * (240 ± 89.7)	33 19 29 (27 ± 7.2)				
	1000	55 * 7 * 0 * (21 ± 29.9)	8 * 0 * 0 * (3 ± 4.6)				
S9mix (+)	0	161 192 170 (174 ± 15.9)	19 18 16 (18 ± 1.5)				
	1000	ND	41 33 41 (38 ± 4.6)				
	1200	199 199 198 (199 ± 0.6)	42 47 41 (43 ± 3.2)				
	1400	183 229 204 (205 ± 23.0)	55 44 61 (53 ± 8.6)				
	1600	235 239 208 (227 ± 16.9)	56 57 48 (54 ± 4.9)				
	1800	237 226 192 (218 ± 23.5)	42 58 64 (55 ± 11.4)				
	2000	236 258 227 (240 ± 15.9)	60 * 57 * 48 * (55 ± 6.2)				
	2200	224 * 251 * 217 * (231 ± 18.0)	ND				
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA				
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5				
	Number of colonies / plate	794 787 840 (807 ± 28.8)	172 181 159 (171 ± 11.1)				
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA				
	Dose (μg /plate)	1	2				
	Number of colonies / plate	1418 1526 1543 (1496 ± 67.8)	299 297 298 (298 ± 1.0)				

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 3-2. Results of reverse mutation test (II) of 3,4-dichloro-1-butene ** 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				
				WP2uvrA			TA98			TA1537	
S9mix (-)	0			18	19	23	19	22	16	13	16	8
				(20 ± 2.6)			(19 ± 3.0)			(12 ± 4.0)	
	39			27	28	29	ND			6	11	7
				(28 ± 1.0)						(8 ± 2.6)	
	78			24	17	36	27	25	28	8	6	10
				(26 ± 9.6)			(27 ± 1.5)			(8 ± 2.0)	
	156			27	33	38	20	35	21	9	9	9
				(33 ± 5.5)			(25 ± 8.4)			(9 ± 0.0)	
	313			26	30	24	0	22	21	5	1	9
				(27 ± 3.1)			(14 ± 12.4)			(5 ± 4.0)	
	625			11	27	31	31	33	23	5	7	0 *
				(23 ± 10.6)			(29 ± 5.3)			(4 ± 3.6)	
	1250			35 *	36 *	29 *	12 *	16 *	26 *	5 *	4 *	9 *
				(33 ± 3.8)			(18 ± 7.2)			(6 ± 2.6)	
	2500						26 *	0 *	0 *			
							(9 ± 15.0)				
S9mix (+)	0			21	31	33	34	26	34	18	21	16
				(28 ± 6.4)			(31 ± 4.6)			(18 ± 2.5)	
	39			23	31	18	35	34	50	21	14	15
				(24 ± 6.6)			(40 ± 9.0)			(17 ± 3.8)	
	78			30	37	34	37	46	39	19	18	16
				(34 ± 3.5)			(41 ± 4.7)			(18 ± 1.5)	
	156			32	32	29	50	37	29	16	22	19
				(31 ± 1.7)			(39 ± 10.6)			(19 ± 3.0)	
	313			39	10	37	45	36	44	18	15	15
				(29 ± 16.2)			(42 ± 4.9)			(16 ± 1.7)	
	625			23	25	13	37	48	30	4	14	18
				(20 ± 6.4)			(38 ± 9.1)			(12 ± 7.2)	
	1250			28 *	21 *	32 *	45 *	31 *	34 *	13 *	9 *	17 *
				(27 ± 5.6)			(37 ± 7.4)			(13 ± 4.0)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			AF2			9AA	
	Dose (μg /plate)			0.01			0.1			80	
	Number of colonies / plate			217	195	204	932	901	970	942	913	905
				(205 ± 11.1)			(934 ± 34.6)			(920 ± 19.5)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			2AA			2AA	
	Dose (μg /plate)			10			0.5			2	
	Number of colonies / plate			1569	1540	1512	321	299	319	256	270	235
				(1540 ± 28.5)			(313 ± 12.2)			(254 ± 17.6)	

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 4-1. Results of confirmation test (I) in reverse mutation test of 3,4-dichloro-1-butene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mear± S.D.)					
		Base - pair substitution type					
		TA100	TA1535				
S9mix (-)	0	155 141 149 (148 ± 7.0)	15 20 13 (16 ± 3.6)				
	250	183 162 214 (186 ± 26.2)	14 23 22 (20 ± 4.9)				
	400	179 238 248 (222 ± 37.3)	32 30 36 (33 ± 3.1)				
	550	230 287 274 (264 ± 29.9)	29 26 34 (30 ± 4.0)				
	700	295 278 272 (282 ± 11.9)	38 39 29 (35 ± 5.5)				
	850	264 277 273 (271 ± 6.7)	52 45 48 (48 ± 3.5)				
	1000	352 * 285 * 228 * (288 ± 62.1)	49 51 36 * (45 ± 8.1)				
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA				
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5				
	Number of colonies / plate	706 767 713 (729 ± 33.4)	181 170 183 (178 ± 7.0)				

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.

Table 4-2. Results of confirmation test (I) in reverse mutation test of 3,4-dichloro-1-butene ** 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		
				WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0			25 25 17 (22 ± 4.6)	22 19 27 (23 ± 4.0)		
	39			22 22 29 (24 ± 4.0)	ND		
	78			26 35 21 (27 ± 7.1)	25 27 24 (25 ± 1.5)		
	156			23 26 33 (27 ± 5.1)	22 30 34 (29 ± 6.1)		
	313			29 31 32 (31 ± 1.5)	21 21 25 (22 ± 2.3)		
	625			21 32 31 (28 ± 6.1)	27 24 23 (25 ± 2.1)		
	1250			25 * 34 * 24 * (28 ± 5.5)	19 * 28 * 24 * (24 ± 4.5)		
	2500				0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)		
S9mix (+)	0			13 21 21 (18 ± 4.6)	26 30 36 (31 ± 5.0)	11 9 11 (10 ± 1.2)	
	39			25 24 24 (24 ± 0.6)	33 29 27 (30 ± 3.1)	6 10 10 (9 ± 2.3)	
	78			26 23 27 (25 ± 2.1)	39 19 24 (27 ± 10.4)	16 9 11 (12 ± 3.6)	
	156			25 32 12 (23 ± 10.1)	25 25 31 (27 ± 3.5)	15 7 11 (11 ± 4.0)	
	313			24 22 32 (26 ± 5.3)	36 21 16 (24 ± 10.4)	10 6 10 (9 ± 2.3)	
	625			25 15 12 (17 ± 6.8)	42 24 24 (30 ± 10.4)	11 9 7 (9 ± 2.0)	
	1250			26 * 21 * 28 * (25 ± 3.6)	15 * 25 * 16 * (19 ± 5.5)	5 * 7 * 7 * (6 ± 1.2)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2	AF2		
	Dose (μg /plate)			0.01	0.1		
	Number of colonies / plate			153 173 156 (161 ± 10.8)	885 874 920 (893 ± 24.0)		
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)			10	0.5	2	
	Number of colonies / plate			1380 1352 1338 (1357 ± 21.4)	415 380 348 (381 ± 33.5)	283 262 239 (261 ± 22.0)	

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 5. Results of confirmation test (II) in reverse mutation test of 3,4-dichloro-1-butene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mea± S.D.)					
		Base - pair substitution type					
		TA100					
S9mix (-)	0	117 96 125 (113 ± 15.0)					
	250	196 174 201 (190 ± 14.4)					
	400	240 179 200 (206 ± 31.0)					
	550	202 174 211 (196 ± 19.3)					
	700	205 217 221 (214 ± 8.3)					
	850	162 231 215 (203 ± 36.1)					
	1000	211 * 232 * 213 * (219 ± 11.6)					
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2					
	Dose (μg /plate)	0.01					
	Number of colonies / plate	622 675 665 (654 ± 28.2)					

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.