

o-Acetoacetotoluidide の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：3648（115-081）

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目 次

1. 要 約	6 頁	
2. 試 験 題 目	7	
3. 試 験 目 的	7	
4. 試 験 番 号	7	
9. 被 験 物 質	9	
10. 試 験 材 料 お よ び 方 法	10	
11. 試 験 結 果	16	
12. 考 察 お よ び 結 論	17	
13. 参 考 と し た 資 料	18	
Figures および Tables		
Figure 1	Bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide in strain TA100	20
Figure 2	Bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide in strain TA1535	21
Figure 3	Bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide in strain WP2 <i>uvrA</i>	22
Figure 4	Bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide in strain TA98	23
Figure 5	Bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide in strain TA1537	24
Table 1	Results of the bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide (1st trial) [direct method : -S9]	25
Table 2	Results of the bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide (1st trial) [activation method : +S9]	26
Table 3	Results of the bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide (2nd trial) [direct method : -S9]	27
Table 4	Results of the bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide (2nd trial) [activation method : +S9]	28

1. 要 約 :

本試験条件下において、o-Acetoacetotoluidide 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。

o-Acetoacetotoluidide 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 および 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。

その結果、o-Acetoacetotoluidide 処理では 156~5000 μ g/プレート のいずれの試験用量においても、ラット肝ミクロソーム (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、直接法および代謝活性化法での陽性対照物質は、それぞれ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 :

o-Acetoacetotoluidide の細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試 験 目 的 :

被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討するため、「新規化学物質に係る試験の方法について」（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）ならびにOECD化学品ガイドライン 471 および 472（1983年5月26日）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「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」（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）ならびにOECDのGLP（1982年）の基準を満たすものとした。

4. 試 験 番 号 :

3 6 4 8 (115-081)

9. 被 験 物 質 :

9.1 被験物質名 o-Acetoacetotoluidide

9.2 ロット番号

9.3 純 度 99.93 wt% (面積百分率法)

9.4 不純物の名称 および純度
アセト酢酸アニライド : 0.06%
アセト酢酸m-トルイダイド : 0.003%

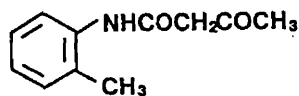
9.5 提 供 元

9.6 別 名 Acetoaceto o-toluidide

9.7 化 学 名 o-Acetoacetotoluidide

9.8 CAS番号 93-68-5

9.9 化学構造



9.10 分 子 量 191.2

9.11 物質の状態 白色針状結晶

9.12 融 点 103.5°C

9.13 溶 解 性
水 (20°C) : 3 g/l
アセトン : 易溶

9.14 安 定 性 良好

9.15 残余被験物質の処理 被験物質の残余は、染色体異常試験終了後に被験物質提供元に返却する。

10. 試験材料および方法：

10.1 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を選択した。

- | | | |
|------------|-----------------|---------------------|
| 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 から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に から分与を受けた。

平成10年1月21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。

菌株の保存に当たっては、各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド (DMSO: GC用; MERCK 社; 純度 99.7%以上, Lot No. K23082678 651) を容量比80:7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mlずつ分注した。これを液体窒素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) に保存 (-80℃) した。

10.2 培地の調製

10.2.1 最少グルコース寒天平板培地 (プレート)

テスメディア AN培地 (オリエンタル酵母工業株式会社: 1997年11月21日製造, Lot No. AN680KM) を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地 Eを含む下記の組成の溶液 30 mlを無菌的にシャーレ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
リン酸二カリウム・無水塩	10	g
リン酸一アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
精製水	200	ml
<hr/>		
グルコース	20	g
精製水	100	ml
<hr/>		
寒天 (No.1; UNIPATH 社; Lot No. 58719)	15	g
精製水	700	ml

10.2.2 トップアガー（軟寒天）

寒天（Bacto-agar：DIFCO 社；Lot No. 103483JB）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で滅菌した後、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン（関東化学株式会社；Lot No. 412E1389）-0.5 mM D-ビオチン（関東化学株式会社；Lot No. 801S1718）水溶液を寒天溶液10容量に対し1容量加え、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. 608E1385）水溶液を同じく1容量加えた。

10.3 試験菌株の前培養

内容量 200 mlのバツフル付三角フラスコに 2.5%ニュートリエントブロス（Oxoid Nutrient Broth No.2：UNIPATH 社；Lot No. 028 59365）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 μ l接種した。培養開始までの間冷却ユニット（ECS-1：東京理化学器械株式会社）を用いて 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）を用い、37℃で8時間振盪（往復振盪：100回/分）培養した。培養終了後の菌懸濁液を使用時まで室温で保存した。

ATPフォトメーター（ルミテスター K-100：キッコーマン株式会社）を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試 験	生 菌 数 ($\times 10^9$ /ml)				
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
本試験(1回目)	3.78	4.15	4.51	3.68	2.99
本試験(2回目)	3.31	3.80	4.61	3.67	3.03

10.4 S9 mix

S9 mix (キッコーマン株式会社 ; Lot No. FSM-372) を試験に使用した。なお、製造後6ヵ月以内の S9 mix を使用した。S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質、誘導方法等ならびに S9 mix の組成を以下に示した。

a. ロット番号	RAA-372
b. 調製日	1997年10月31日 (誘導物質投与開始後5日目)
c. 使用動物	ラット : Sprague-Dawley 系
d. 性 / 週齢	雄 / 7週齢
e. 体重	186 ~ 225 g
f. 臓器	肝臓
g. 誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
h. 投与量 および 投与回数	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)
i. 投与方法	腹腔内投与
j. 蛋白含量	25.3 mg/ml

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

10.5 被験物質液

10.5.1 被験物質液の調製

被験物質を DMSO (Lot No. K23082678 651) に溶解させ調製原液とした。この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。

10.6 対照群

10.6.1 溶媒対照

溶媒対照として、使用溶媒の DMSO のみで試験した。

10.6.2 陽性対照

DMSO (MERCK 社 ; Lot No. K23082678 651) を用いて陽性対照物質を溶解し、少量ずつ分注した後、凍結保存 (-20°C) した。これを融解した後、試験に用いた。

各菌株について、下記に示した用量で試験した。これらの試験用量は、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』に準じて設定した。

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
〃	TA98	〃	0.1 〃
〃	TA1535	NaN_3	0.5 〃
〃	TA1537	9-AA	80 〃
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 μg /プレート
〃	TA98	〃	0.5 〃
〃	TA1535	〃	2 〃
〃	TA1537	〃	2 〃
大腸菌	WP2 <i>uvrA</i>	〃	10 〃

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 ; 純度 98.0~102.0%, Lot No. CAP0185)

NaN_3 : 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. TPR1596)

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩 (ALDRICH 社 ; 純度 98.0%, Lot No. AQ 08326HN)

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. DLH6052)

10.6.3 無菌試験

被験物質液 (調製原液) ならびに S9 mix について無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100 μl あるいは S9 mix 500 μl にトップアガーをそれぞれ 2 ml添加し、プレート上に注いだ。37 $^{\circ}\text{C}$ の条件で48時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。

調製原液および S9 mix のいずれについても2枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

10.7 復帰突然変異試験

10.7.1 試験用量

1枚のプレートを用いて実施した予備的な試験結果を以下に示す。

試験用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 m i x	復帰突然変異コロニー数				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
0	—	114	10	14	16	5
19.5	—	103	10	20	19	1
78.1	—	91	14	11	16	4
313	—	96	7	14	31	7
1250	—	75	11	23	17	3
0	+	135	19	14	29	6
19.5	+	131	8	20	25	9
78.1	+	131	19	24	36	6
313	+	130	10	25	25	11
1250	+	121	5	30	22	10

いずれの処理群においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されず、復帰突然変異コロニー数についても増加傾向は認められなかった。本結果を基に、本試験においては以下に示した用量を最高用量とし、それぞれ6用量（公比2）を設定した。

試 験	最高用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)				
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
直 接 法	5000	5000	5000	5000	5000
代謝活性化法	5000	5000	5000	5000	5000

10.7.2 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を $100\mu\text{l}$ 、次いで直接法の場合、 0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を $500\mu\text{l}$ 、代謝活性化法の場合、S9 mix を $500\mu\text{l}$ 分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 $100\mu\text{l}$ を加えた後、振盪恒温器 (M-100^N: タイテック株式会社) を用いて 37°C で20分間振盪培養 (プレインキュベーション) した。培養終了後、トップアガーを 2ml 添加し、内容を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。重層したトップアガーが固化した後、恒温器を用いて 37°C の条件で48時間各プレートを培養した。

1用量当たり3枚のプレートを用いた。また、再現性を確認するため、本試験を独立して2回実施した。

10.7.3 コロニー数計測

被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株の生育状態について実体顕微鏡（×60）を用いて観察した。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）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。

10.8 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。

11. 試験結果：

11.1 本試験（1回目）

試験結果を Figure 1~5 および Table 1~2 に示した。

o-Acetoacetotoluidide 処理群では直接法ならびに代謝活性化法とも試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。

復帰突然変異により生じたコロニー数については、各被験物質処理群とも溶媒対照群の値と比較して明確な増加は認められなかった。

一方、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。

なお、コロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

11.2 本試験（2回目）

試験結果を Figure 1~5 および Table 3~4 に示した。

被験物質処理群による生育阻害作用はいずれの試験用量においても観察されず、復帰突然変異コロニー数についても溶媒対照群と比較して増加傾向は認められなかった。

一方、陽性対照物質は各試験菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。

なお、コロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

o-Acetoacetotoluidide 調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

以上、2回繰り返して実施した試験において、直接法および代謝活性化法の両試験とも再現性が確認された。

12. 考察および結論：

o-Acetoacetotoluidide 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 5000 μ g/プレートまで検討した。その結果，o-Acetoacetotoluidide 処理群では直接法および代謝活性化法のいずれにおいても，溶媒対照と比較し復帰突然変異コロニー数の増加傾向は認められなかった。

なお，溶媒対照群あるいは陽性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，本試験は適切な条件でなされたと判断された。

なお，類縁化合物の変異原性についての報告はなかった。

以上の試験結果から，本試験条件下においてo-Acetoacetotoluidide 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. Mutat. Res., 31, 347~364, 1975.
- 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.
- 石館 基 監修 : 微生物を用いる変異原性試験データ集, エル・アイ・シー, 1991.

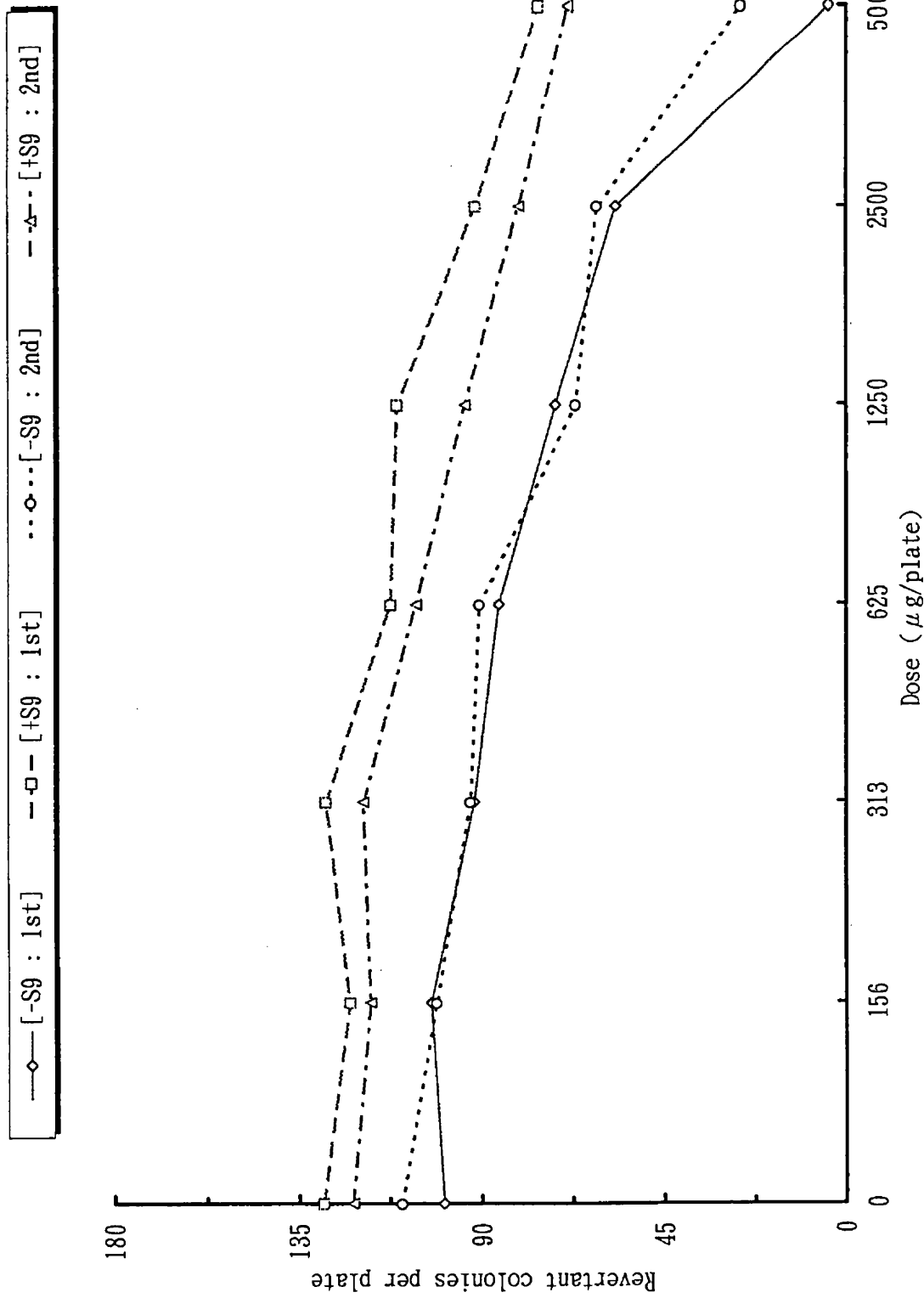


Figure 1. Bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide in strain TA100

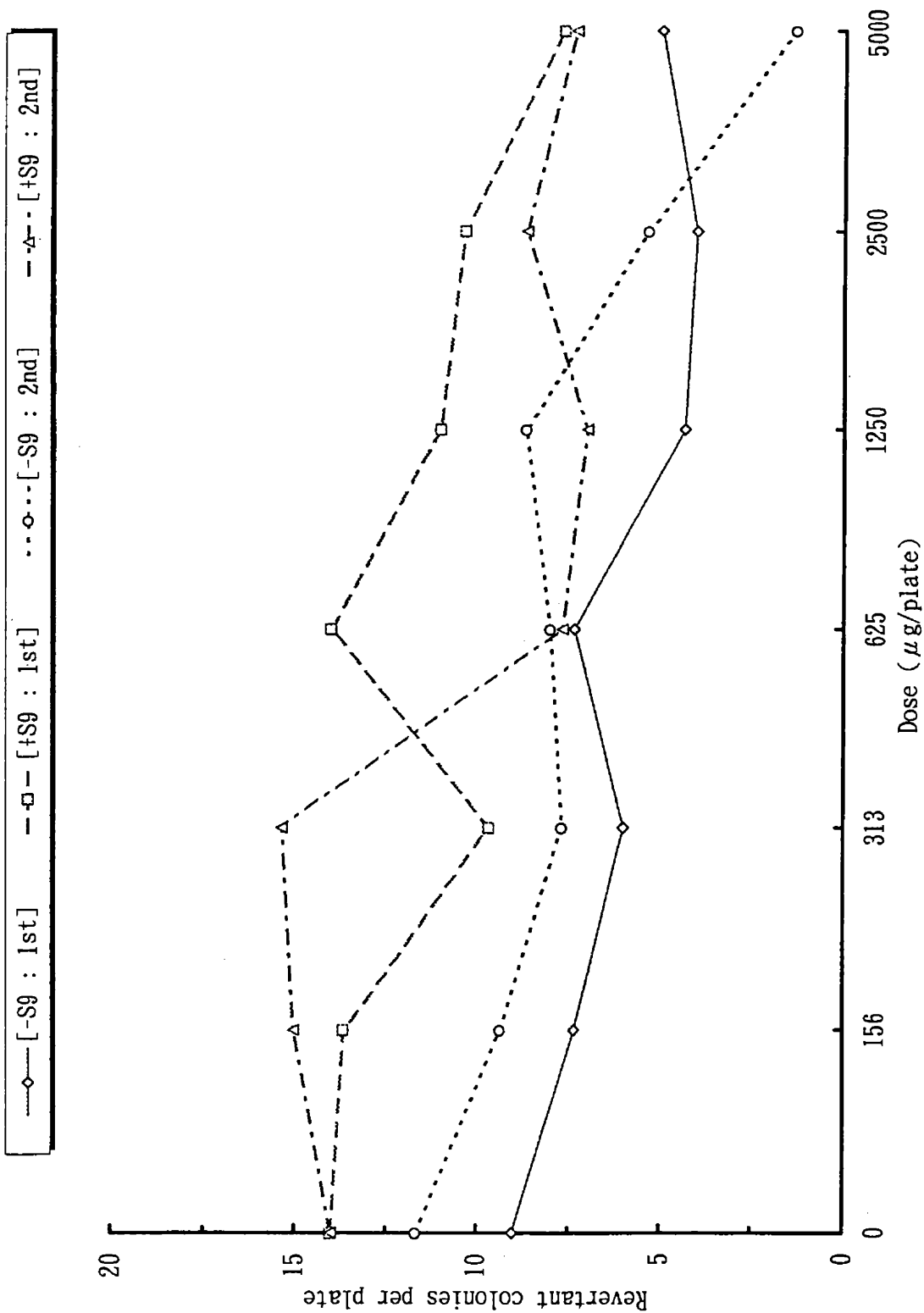


Figure 2. Bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide in strain TAI535

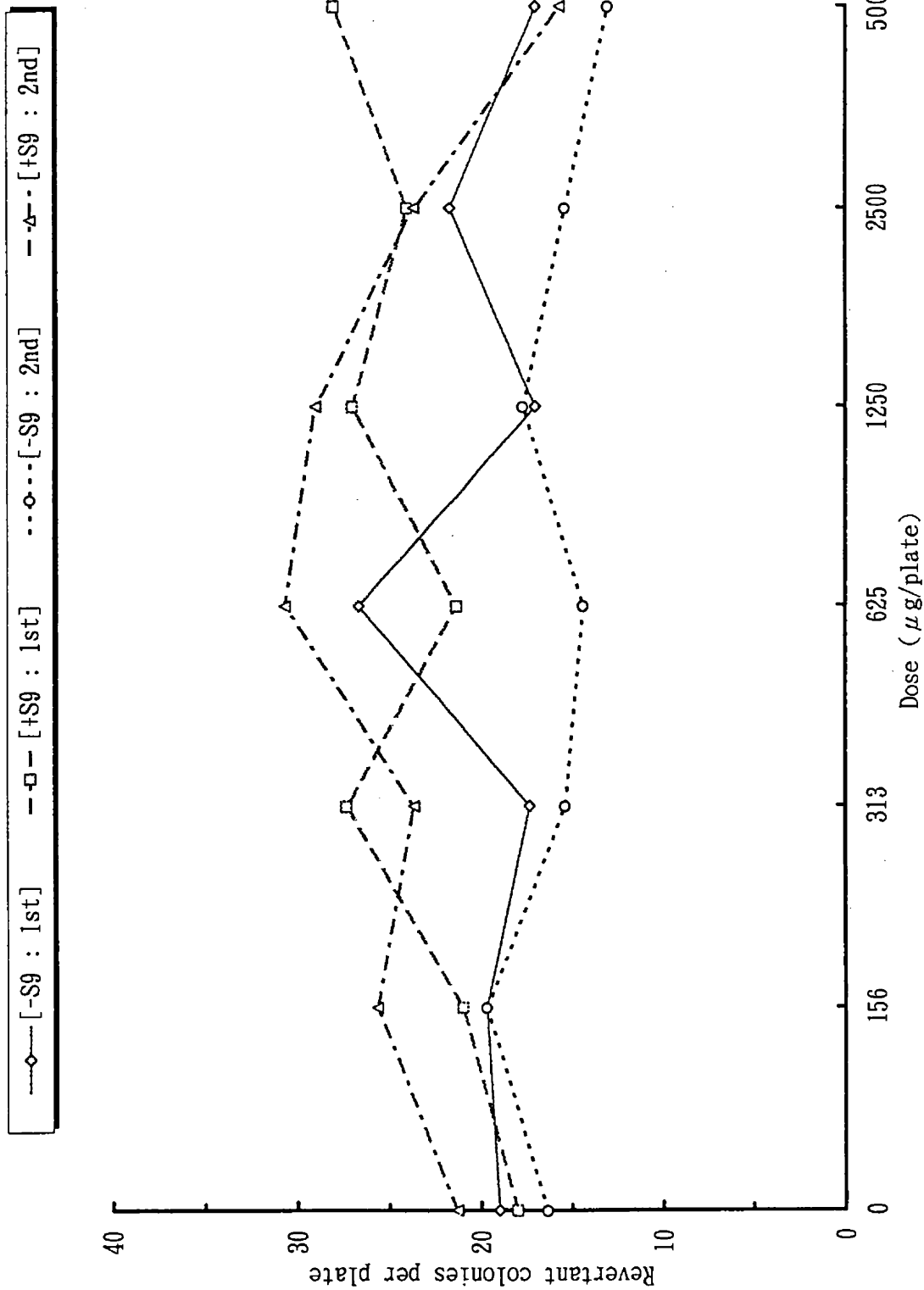


Figure 3. Bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide in strain WP2uvrA

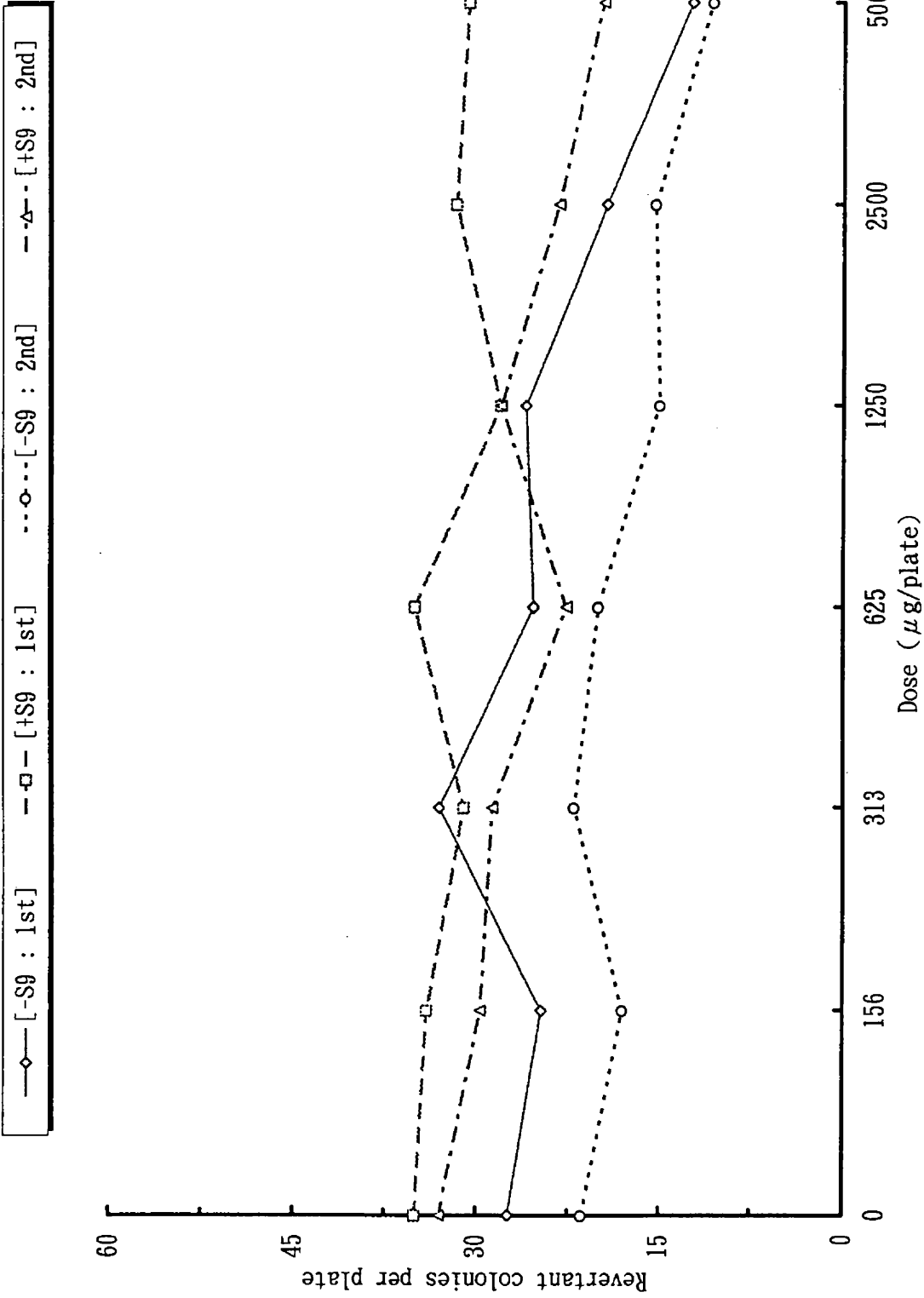


Figure 4. Bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide in strain TA98

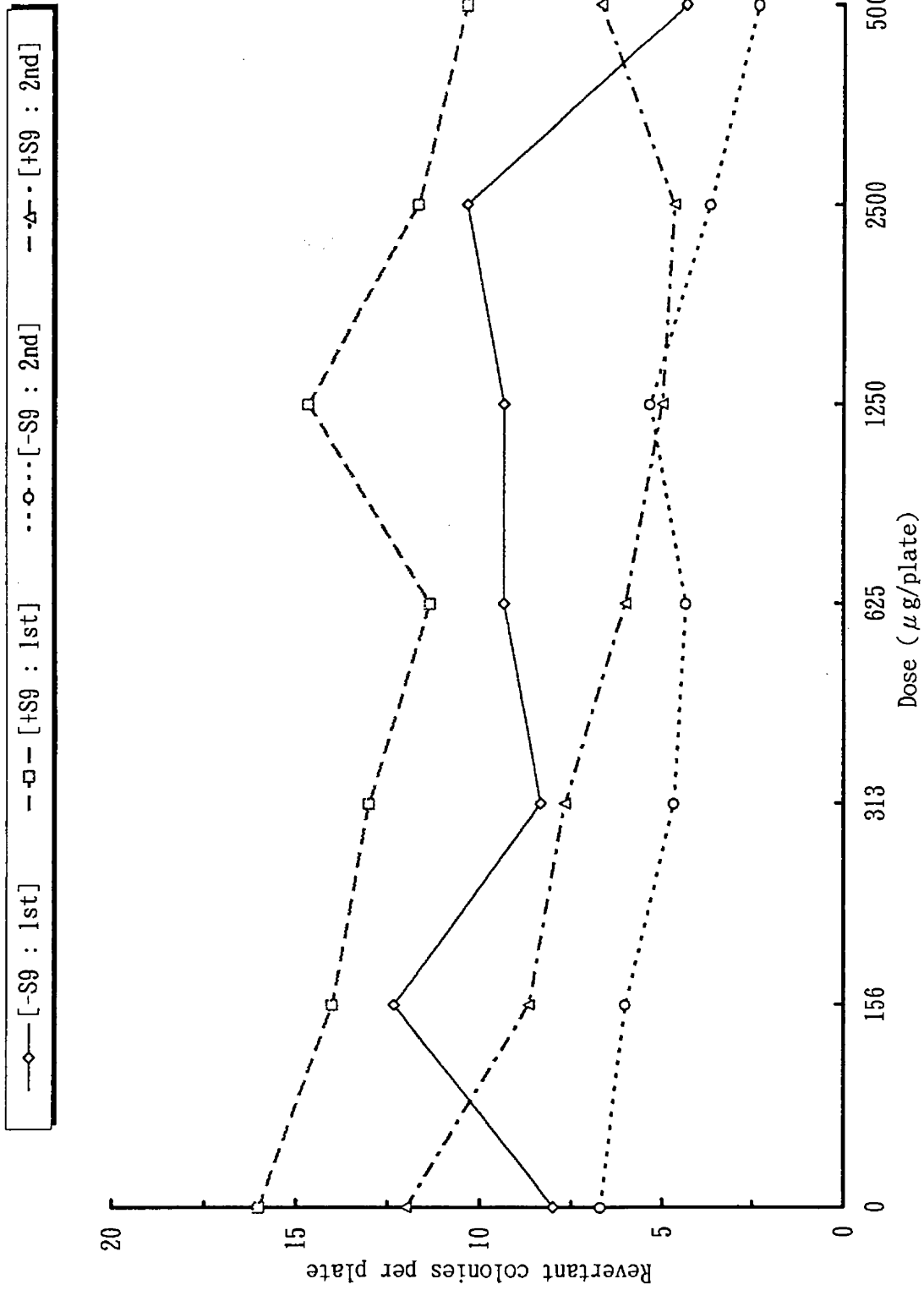


Figure 5. Bacterial reversion test of o-Acetoacetotoluidide in strain TAI537

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

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
DMSO#	0	100 [99 \pm 4]	9 8 10 [9 \pm 1]	19 21 17 [19 \pm 2]	27 27 28 [27 \pm 1]	7 8 9 [8 \pm 1]
test sub.	156	108 96 103 [102 \pm 6]	7 7 8 [7 \pm 1]	18 23 18 [20 \pm 3]	25 26 23 [25 \pm 2]	13 14 10 [12 \pm 2]
	313	89 94 92 [92 \pm 3]	6 7 5 [6 \pm 1]	16 18 18 [17 \pm 1]	35 29 35 [33 \pm 3]	8 9 8 [8 \pm 1]
	625	85 86 86 [86 \pm 1]	8 7 7 [7 \pm 1]	26 25 29 [27 \pm 2]	22 28 26 [25 \pm 3]	9 9 10 [9 \pm 1]
	1250	68 72 75 [72 \pm 4]	3 6 4 [4 \pm 2]	20 14 17 [17 \pm 3]	27 27 24 [26 \pm 2]	9 12 7 [9 \pm 3]
	2500	58 61 51 [57 \pm 5]	4 4 4 [4 \pm 0]	23 20 22 [22 \pm 2]	19 20 19 [19 \pm 1]	10 11 10 [10 \pm 1]
	5000	5 6 2 [4 \pm 2]	5 6 4 [5 \pm 1]	16 18 17 [17 \pm 1]	16 12 9 [12 \pm 4]	5 3 5 [4 \pm 1]
Positive control	459 470 456 ^{a)} [462 \pm 7]	437 395 415 ^{b)} [416 \pm 21]	147 136 131 ^{a)} [138 \pm 8]	611 625 623 ^{c)} [620 \pm 8]	381 352 368 ^{d)} [367 \pm 15]	

: Solvent control

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) : 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

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

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]					
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
DMSO#	0	128 [129 \pm 4]	133 [14 \pm 2]	13 [18 \pm 3]	17 16 21 [35 \pm 2]	37 33 35 [16 \pm 2]	18 16 14
test sub.	156	129 120 118 [122 \pm 6]	11 16 14 [14 \pm 3]	22 21 20 [21 \pm 1]	38 30 34 [34 \pm 4]	13 17 12 [14 \pm 3]	
	313	128 133 124 [128 \pm 5]	12 9 8 [10 \pm 2]	28 30 24 [27 \pm 3]	30 34 29 [31 \pm 3]	12 12 15 [13 \pm 2]	
	625	115 112 110 [112 \pm 3]	15 12 15 [14 \pm 2]	19 22 23 [21 \pm 2]	33 35 37 [35 \pm 2]	14 9 11 [11 \pm 3]	
	1250	115 108 109 [111 \pm 4]	8 12 13 [11 \pm 3]	26 29 26 [27 \pm 2]	31 25 28 [28 \pm 3]	16 14 14 [15 \pm 1]	
	2500	96 93 85 [91 \pm 6]	12 9 10 [10 \pm 2]	23 24 25 [24 \pm 1]	29 35 31 [32 \pm 3]	12 9 14 [12 \pm 3]	
	5000	82 75 71 [76 \pm 6]	5 9 9 [8 \pm 2]	28 28 28 [28 \pm 0]	32 32 28 [31 \pm 2]	9 11 11 [10 \pm 1]	
Positive control		648 657 674 ^{a)} [660 \pm 13]	390 399 378 ^{b)} [389 \pm 11]	680 668 675 ^{c)} [674 \pm 6]	236 241 221 ^{d)} [233 \pm 10]	180 166 162 ^{b)} [169 \pm 9]	

: 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 o-Acetoacetotoluide (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S. D.]					
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
DMSO#	0	104 [110 \pm 5]	9 15 11 [12 \pm 3]	17 16 16 [16 \pm 1]	19 23 22 [21 \pm 2]	7 6 7 [7 \pm 1]	
test sub.	156	96 100 107 [101 \pm 6]	12 8 8 [9 \pm 2]	22 19 18 [20 \pm 2]	21 17 16 [18 \pm 3]	6 7 5 [6 \pm 1]	
	313	93 94 91 [93 \pm 2]	8 7 8 [8 \pm 1]	18 15 13 [15 \pm 3]	20 22 24 [22 \pm 2]	6 4 4 [5 \pm 1]	
	625	92 87 92 [90 \pm 3]	6 10 8 [8 \pm 2]	17 12 14 [14 \pm 3]	18 19 23 [20 \pm 3]	5 4 4 [4 \pm 1]	
	1250	70 66 64 [67 \pm 3]	9 7 10 [9 \pm 2]	17 21 15 [18 \pm 3]	17 16 12 [15 \pm 3]	5 5 6 [5 \pm 1]	
	2500	60 61 63 [61 \pm 2]	6 4 6 [5 \pm 1]	12 17 17 [15 \pm 3]	14 17 15 [15 \pm 2]	5 3 3 [4 \pm 1]	
	5000	33 21 24 [26 \pm 6]	3 0 1 [1 \pm 2]	16 10 13 [13 \pm 3]	9 12 11 [11 \pm 2]	0 4 3 [2 \pm 2]	
Positive control	435 423 438 ^{a)} [432 \pm 8]	399 466 438 ^{b)} [434 \pm 34]	119 123 123 ^{a)} [122 \pm 2]	633 621 587 ^{c)} [614 \pm 24]	587 648 647 ^{a)} [627 \pm 35]		

: Solvent control

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) : 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

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

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]					
		TA100	TA1535	WP2 uvra	TA98	TA1537	
DMSO#	0	128 [122 \pm 6]	17 14 11 [14 \pm 3]	26 19 19 [21 \pm 4]	32 35 32 [33 \pm 2]	11 14 11 [12 \pm 2]	
test sub.	156	119 111 122 [117 \pm 6]	17 16 12 [15 \pm 3]	25 22 30 [26 \pm 4]	34 26 29 [30 \pm 4]	10 7 9 [9 \pm 2]	
	313	123 117 117 [119 \pm 3]	14 16 16 [15 \pm 1]	22 25 24 [24 \pm 2]	29 26 31 [29 \pm 3]	9 7 7 [8 \pm 1]	
	625	99 107 112 [106 \pm 7]	9 8 6 [8 \pm 2]	30 31 31 [31 \pm 1]	25 20 23 [23 \pm 3]	6 5 7 [6 \pm 1]	
	1250	85 93 104 [94 \pm 10]	6 9 6 [7 \pm 2]	26 31 30 [29 \pm 3]	30 28 26 [28 \pm 2]	7 3 5 [5 \pm 2]	
	2500	79 77 86 [81 \pm 5]	6 9 11 [9 \pm 3]	23 21 27 [24 \pm 3]	29 19 22 [23 \pm 5]	3 6 5 [5 \pm 2]	
	5000	74 62 70 [69 \pm 6]	6 7 9 [7 \pm 2]	11 22 14 [16 \pm 6]	17 19 23 [20 \pm 3]	5 6 9 [7 \pm 2]	
Positive control		614 612 596 ^{a)} [607 \pm 10]	316 344 338 ^{b)} [333 \pm 15]	522 617 598 ^{c)} [579 \pm 50]	222 254 226 ^{d)} [234 \pm 17]	140 119 147 ^{b)} [135 \pm 15]	

: 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