



1, 2, 4-トリメチルベンゼンの
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
材料および方法	3
結果および考察	7
結 論	8
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1～3	

【要 約】

1, 2, 4-トリメチルベンゼ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、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、S9 mix 無添加試験ではTA100, TA98 および TA1537 は150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA1535 および WP2 *uvrA* は500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、S9 mix 添加試験ではTA100, TA1535, WP2 *uvrA* および TA1537 は500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA98 は1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められた。また、TA1535 のS9 mix 無添加試験とTA1537 のS9 mix 添加試験では、本試験Iで抗菌性のない用量が4用量に達しなかったため、本試験の用量を下げた。したがって、本試験ではS9 mix 無添加試験をTA100, TA1535, TA98 および TA1537 は7.81~250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は15.6~500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で、S9 mix 添加試験をTA1537 は7.81~250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA100, TA1535 および WP2 *uvrA* は15.6~500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 は31.3~1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で用量を設定して実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、1, 2, 4-トリメチルベンゼンは、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】

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、1,2,4-トリメチルベンゼンについて、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 *uvrA*
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 *uvrA* 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ものをを用い、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 pKM 101 (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°C 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〕

1, 2, 4-トリメチルベンゼン (TMB、CAS No. 95-63-6) は、分子量 120.20 の無色透明液体である。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 98.75% (不純物：不明) であり、
から供与された。被験物質は、使用時まで室温遮光保管した。

TMBは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号：KCL2807 および KCG5200、和光純薬工業(株)) に 50、10 または 2.5 mg/ml になるように溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

TMBのDMSO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 (78.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 溶液は、当該試験の本試験IIで調製したのについて、高濃度 (60.0 mg/ml) 溶液は、当研究所で実施した染色体異常試験 (G-94-029) で調製したのについて、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、104 および 99.2%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Ⅱ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%以上)
9AA	: 9-アミリアクリン	(Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641, 純度98%以上)
2AA	: 2-アミアントラセン	(和光純薬工業(株))	ロット番号 DSF2950, 純度90%以上)

AF2, 2AA は DMSO (和光純薬工業(株)) 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) バクアガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ビオチン	0.5 mM

* : WP2 *uvrA* 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)製の最少寒天培地（ロット番号：DJ030HJ、1994年8月11日製造、DJ040KJ、同年11月21日製造および DJ010BK、1995年2月6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	水酸化ナトリウム	0.66 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	バクアガー (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 (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	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
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-309、1994年 5 月 13 日製造および RAA-317、同年 10 月 27 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 2 ml、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°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、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、本試験は同一用量について 2 回実施し、結果の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 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。TMBについて 50~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、TA100, TA98 および TA1537 は 150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA1535 および WP2 *uvrA* は 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では TA100, TA1535, WP2 *uvrA* および TA1537 は 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA98 は 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験では 250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1535 および WP2 *uvrA* は 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$)、S9 mix 添加試験では 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA98 は 1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) とした。

〔本試験〕

TA1535 の S9 mix 無添加試験と TA1537 の S9 mix 添加試験では、本試験 I において抗菌性のない用量が 4 用量に達しなかったため、本試験における最高用量をともに 250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に下げた。

2 回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。TMBの用量を、S9 mix 無添加試験では TA100, TA1535, TA98 および TA1537 は 7.81~250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は 15.6~500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で、S9 mix 添加試験では TA1537 は 7.81~250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA100, TA1535 および WP2 *uvrA* は 15.6~500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 は 31.3~1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を 2 として試験を実施した。その結果、2 回の試験のいずれも、用いた 5 種類の検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験において、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。

TMB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、1, 2, 4-トリメチルベンゼンは、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。

【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 1,2,4-trimethylbenzene ** on bacteria

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							
S9mix (-)	0	95	100	111	16	14	16	24	22	21	25	27	21	10	7	12	(102 \pm 8.2)	(15 \pm 1.2)	(22 \pm 1.5)	(24 \pm 3.1)	(10 \pm 2.5)
	50	118			8			20			22			9							
	150	91 *			14			19			18 *			5 *							
	500	73 *			10 *			15 *			14 *			6 *							
	1500	83 *			10 *			25 *			26 *			4 *							
	5000	88 *			14 *			21 *			14 *			4 *							
S9mix (+)	0	102	93	115	17	17	15	27	21	27	39	24	36	17	14	17	(103 \pm 11.1)	(16 \pm 1.2)	(25 \pm 3.5)	(33 \pm 7.9)	(16 \pm 1.7)
	50	99			18			21			37			22							
	150	74			13			27			32			18							
	500	77 *			13 *			28 *			33			11 *							
	1500	93 *			16 *			28 *			29 *			15 *							
	5000	74 *			6 *			23 *			22 *			8 *							
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							
Positive control 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	542	539	556	312	298	323	130	137	122	613	833	730	648	610	640	(546 \pm 9.1)	(311 \pm 12.5)	(130 \pm 7.5)	(725 \pm 110.1)	(633 \pm 20.0)
	Number of colonies / plate	1369	1337	1260	323	243	301	1462	1479	1194	415	434	417	323	320	320	(1322 \pm 56.0)	(289 \pm 41.3)	(1378 \pm 159.9)	(422 \pm 10.4)	(321 \pm 1.7)

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 98.75%.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 1,2,4-trimethylbenzene ** 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					
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9mix (-)	0	136 (142 ± 8.7)	138 (142 ± 8.7)	152 (142 ± 8.7)	5 (11 ± 5.2)	14 (11 ± 5.2)	14 (11 ± 5.2)	19 (26 ± 6.5)	32 (26 ± 6.5)	26 (26 ± 6.5)	18 (25 ± 8.1)	34 (25 ± 8.1)	24 (25 ± 8.1)	5 (6 ± 2.3)	5 (6 ± 2.3)	9 (6 ± 2.3)
	7.81	133 (127 ± 6.0)	121 (127 ± 6.0)	127 (127 ± 6.0)	6 (10 ± 3.5)	12 (10 ± 3.5)	12 (10 ± 3.5)	ND			15 (23 ± 7.4)	26 (23 ± 7.4)	29 (23 ± 7.4)	7 (7 ± 3.5)	11 (7 ± 3.5)	4 (7 ± 3.5)
	15.6	132 (127 ± 4.6)	126 (127 ± 4.6)	123 (127 ± 4.6)	12 (9 ± 2.6)	7 (9 ± 2.6)	8 (9 ± 2.6)	12 (19 ± 9.6)	30 (19 ± 9.6)	15 (19 ± 9.6)	23 (23 ± 4.0)	27 (23 ± 4.0)	19 (23 ± 4.0)	13 (7 ± 5.1)	6 (7 ± 5.1)	3 (7 ± 5.1)
	31.3	131 (136 ± 5.7)	142 (136 ± 5.7)	134 (136 ± 5.7)	20 (15 ± 5.5)	15 (15 ± 5.5)	9 (15 ± 5.5)	21 (18 ± 2.9)	16 (18 ± 2.9)	16 (18 ± 2.9)	25 (27 ± 3.5)	25 (27 ± 3.5)	31 (27 ± 3.5)	6 (5 ± 1.7)	3 (5 ± 1.7)	6 (5 ± 1.7)
	62.5	121 (111 ± 12.5)	97 (111 ± 12.5)	115 (111 ± 12.5)	9 (10 ± 3.2)	14 (10 ± 3.2)	8 (10 ± 3.2)	19 (20 ± 2.1)	18 (20 ± 2.1)	22 (20 ± 2.1)	25 (24 ± 1.0)	23 (24 ± 1.0)	24 (24 ± 1.0)	16 (10 ± 5.6)	5 (10 ± 5.6)	9 (10 ± 5.6)
	125	102 * (100 ± 7.8)	91 * (100 ± 7.8)	106 * (100 ± 7.8)	7 * (11 ± 5.9)	9 * (11 ± 5.9)	18 * (11 ± 5.9)	23 (21 ± 3.8)	17 (21 ± 3.8)	24 (21 ± 3.8)	22 * (20 ± 2.5)	20 * (20 ± 2.5)	17 * (20 ± 2.5)	5 * (8 ± 3.8)	6 * (8 ± 3.8)	12 * (8 ± 3.8)
	250	86 * (84 ± 4.0)	86 * (84 ± 4.0)	79 * (84 ± 4.0)	12 * (11 ± 4.2)	6 * (11 ± 4.2)	14 * (11 ± 4.2)	14 * (19 ± 5.0)	20 * (19 ± 5.0)	24 * (19 ± 5.0)	30 * (20 ± 9.5)	20 * (20 ± 9.5)	11 * (20 ± 9.5)	6 * (6 ± 0.6)	6 * (6 ± 0.6)	5 * (6 ± 0.6)
	500							24 * (20 ± 4.5)	20 * (20 ± 4.5)	15 * (20 ± 4.5)						
S9mix (+)	0	117 (129 ± 11.1)	130 (129 ± 11.1)	139 (129 ± 11.1)	14 (15 ± 1.2)	14 (15 ± 1.2)	16 (15 ± 1.2)	25 (24 ± 2.6)	21 (24 ± 2.6)	26 (24 ± 2.6)	36 (35 ± 6.0)	29 (35 ± 6.0)	41 (35 ± 6.0)	19 (23 ± 7.8)	18 (23 ± 7.8)	32 (23 ± 7.8)
	7.81	ND			ND			ND			ND			14 (17 ± 3.5)	21 (17 ± 3.5)	17 (17 ± 3.5)
	15.6	136 (146 ± 9.5)	155 (146 ± 9.5)	147 (146 ± 9.5)	19 (21 ± 2.1)	23 (21 ± 2.1)	22 (21 ± 2.1)	15 (25 ± 9.1)	26 (25 ± 9.1)	33 (25 ± 9.1)	ND			22 (18 ± 4.0)	18 (18 ± 4.0)	14 (18 ± 4.0)
	31.3	136 (145 ± 9.0)	154 (145 ± 9.0)	145 (145 ± 9.0)	15 (12 ± 3.0)	12 (12 ± 3.0)	9 (12 ± 3.0)	25 (25 ± 1.5)	23 (25 ± 1.5)	26 (25 ± 1.5)	45 (43 ± 2.5)	43 (43 ± 2.5)	40 (43 ± 2.5)	17 (15 ± 2.0)	15 (15 ± 2.0)	13 (15 ± 2.0)
	62.5	130 (148 ± 19.1)	146 (148 ± 19.1)	168 (148 ± 19.1)	12 (17 ± 4.2)	18 (17 ± 4.2)	20 (17 ± 4.2)	23 (23 ± 0.6)	24 (23 ± 0.6)	23 (23 ± 0.6)	39 (35 ± 10.6)	23 (35 ± 10.6)	43 (35 ± 10.6)	15 (18 ± 2.5)	20 (18 ± 2.5)	18 (18 ± 2.5)
	125	141 (121 ± 17.7)	112 (121 ± 17.7)	109 (121 ± 17.7)	10 (11 ± 2.1)	13 (11 ± 2.1)	9 (11 ± 2.1)	25 (26 ± 2.3)	29 (26 ± 2.3)	25 (26 ± 2.3)	33 (32 ± 5.6)	26 (32 ± 5.6)	37 (32 ± 5.6)	14 * (14 ± 3.5)	10 * (14 ± 3.5)	17 * (14 ± 3.5)
	250	91 * (109 ± 16.1)	116 * (109 ± 16.1)	121 * (109 ± 16.1)	13 * (12 ± 1.2)	11 * (12 ± 1.2)	11 * (12 ± 1.2)	24 (23 ± 3.6)	26 (23 ± 3.6)	19 (23 ± 3.6)	42 (32 ± 9.1)	24 (32 ± 9.1)	31 (32 ± 9.1)	12 * (11 ± 1.5)	11 * (11 ± 1.5)	9 * (11 ± 1.5)
	500	105 * (100 ± 7.8)	91 * (100 ± 7.8)	104 * (100 ± 7.8)	9 * (8 ± 1.2)	7 * (8 ± 1.2)	9 * (8 ± 1.2)	25 * (17 ± 6.8)	15 * (17 ± 6.8)	12 * (17 ± 6.8)	25 * (26 ± 6.6)	33 * (26 ± 6.6)	20 * (26 ± 6.6)			
	1000										20 * (18 ± 2.6)	19 * (18 ± 2.6)	15 * (18 ± 2.6)			
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	770 (715 ± 48.8)	678 (715 ± 48.8)	696 (715 ± 48.8)	142 (158 ± 14.8)	171 (158 ± 14.8)	162 (158 ± 14.8)	135 (123 ± 11.5)	112 (123 ± 11.5)	123 (123 ± 11.5)	756 (797 ± 37.9)	803 (797 ± 37.9)	831 (797 ± 37.9)	742 (710 ± 75.3)	764 (710 ± 75.3)	624 (710 ± 75.3)
	Number of colonies / plate	1417 (1352 ± 58.1)	1332 (1352 ± 58.1)	1306 (1352 ± 58.1)	333 (330 ± 4.4)	332 (330 ± 4.4)	325 (330 ± 4.4)	1435 (1436 ± 28.0)	1465 (1436 ± 28.0)	1409 (1436 ± 28.0)	389 (371 ± 17.1)	369 (371 ± 17.1)	355 (371 ± 17.1)	222 (205 ± 14.8)	198 (205 ± 14.8)	195 (205 ± 14.8)

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 98.75%.

ND : Not done

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 1,2,4-trimethylbenzene ** on bacteria

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		
S9mix (-)	0	115	106	120	16	15	12	25	26	36	32	23	21	7	8	6
		(114 \pm 7.1)			(14 \pm 2.1)			(29 \pm 6.1)			(25 \pm 5.9)			(7 \pm 1.0)		
	7.81	105	128	105	13	8	11	ND			22	25	21	5	6	7
		(113 \pm 13.3)			(11 \pm 2.5)						(23 \pm 2.1)			(6 \pm 1.0)		
	15.6	93	113	117	13	14	11	25	17	17	19	23	29	9	3	13
		(108 \pm 12.9)			(13 \pm 1.5)			(20 \pm 4.6)			(24 \pm 5.0)			(8 \pm 5.0)		
	31.3	101	107	97	16	22	15	26	27	27	22	23	26	3	9	7
		(102 \pm 5.0)			(18 \pm 3.8)			(27 \pm 0.6)			(24 \pm 2.1)			(6 \pm 3.1)		
	62.5	125	106	109	12	10	12	20	14	20	26	26	22	7	7	6
	(113 \pm 10.2)			(11 \pm 1.2)			(18 \pm 3.5)			(25 \pm 2.3)			(7 \pm 0.6)			
125	95 *	108 *	84 *	5 *	13 *	12 *	17	22	25	16 *	16 *	16 *	5 *	4 *	6 *	
	(96 \pm 12.0)			(10 \pm 4.4)			(21 \pm 4.0)			(16 \pm 0.0)			(5 \pm 1.0)			
250	55 *	82 *	62 *	6 *	6 *	8 *	17 *	16 *	19 *	17 *	7 *	14 *	0 *	6 *	3 *	
	(66 \pm 14.0)			(7 \pm 1.2)			(17 \pm 1.5)			(13 \pm 5.1)			(3 \pm 3.0)			
500							13 *	14 *	14 *							
							(14 \pm 0.6)									
S9mix (+)	0	129	117	119	16	11	10	39	26	27	37	31	35	15	7	15
		(122 \pm 6.4)			(12 \pm 3.2)			(31 \pm 7.2)			(34 \pm 3.1)			(12 \pm 4.6)		
	7.81	ND			ND			ND			ND			18	20	18
														(19 \pm 1.2)		
	15.6	111	89	111	10	7	11	31	30	29	ND			18	19	19
		(104 \pm 12.7)			(9 \pm 2.1)			(30 \pm 1.0)						(19 \pm 0.6)		
	31.3	109	118	105	6	9	11	32	25	54	23	34	31	16	15	18
		(111 \pm 6.7)			(9 \pm 2.5)			(37 \pm 15.1)			(29 \pm 5.7)			(16 \pm 1.5)		
	62.5	102	106	120	13	10	16	23	30	30	27	25	29	21	14	18
	(109 \pm 9.5)			(13 \pm 3.0)			(28 \pm 4.0)			(27 \pm 2.0)			(18 \pm 3.5)			
125	117	96	107	8	14	10	22	30	21	35	31	25	9	20	24	
	(107 \pm 10.5)			(11 \pm 3.1)			(24 \pm 4.9)			(30 \pm 5.0)			(18 \pm 7.8)			
250	88 *	103 *	81 *	10	10	16	23	26	18	32	33	25	13 *	21 *	21 *	
	(91 \pm 11.2)			(12 \pm 3.5)			(22 \pm 4.0)			(30 \pm 4.4)			(18 \pm 4.6)			
500	95 *	108 *	89 *	12 *	15 *	16 *	22 *	19 *	22 *	21 *	18 *	32 *				
	(97 \pm 9.7)			(14 \pm 2.1)			(21 \pm 1.7)			(24 \pm 7.4)						
1000										20 *	20 *	14 *				
										(18 \pm 3.5)						
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		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1100	1146	1128	315	292	311	1364	1438	1356	298	300	295	299	266	221
		(1125 \pm 23.2)			(306 \pm 12.3)			(1386 \pm 45.2)			(298 \pm 2.5)			(262 \pm 39.2)		

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 98.75%.

ND : Not done