



4, 4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)
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】

4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)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, TA1535 および TA1537 はすべての用量で、TA98 は150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA* では抗菌性は認められなかった。また、S9 mix 添加試験では *S. typhimurium* の4菌株はいずれも500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA* では抗菌性は認められなかった。したがって、本試験ではS9 mix 無添加試験をTA100, TA1535 および TA1537 は0.781~50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 は3.13~200 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は313~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で、S9 mix 添加試験を *S. typhimurium* の4菌株は12.5~800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は313~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)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】

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、4,4'-チオビス（6-tert-ブチル-m-クレゾール）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ものであります。

【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
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扱い、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Na 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〕

4, 4'-チオビス (6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール) (TBBC、CAS No. 96-69-5) は、分子量 358.54 の白色結晶性粉末である。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%以上 (不純物：不明) であ
り、
から供与された。被験物質は、使用時まで室温保管した。

T B B C 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 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。

T B B C 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、本試験Ⅱで調製した低濃度 ($7.81\text{ }\mu\text{g/ml}$) 溶液および高濃度 (50.0 mg/ml) 溶液について、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、100 および 98.6%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）。

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 3）。

〔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	: 72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-アミナクリジン (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(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7ガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピオチン	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日製造および DJ040KJ、同年11月21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7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、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 およびトッパアガー 2 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。T B B C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, TA1535 および TA1537 はすべての用量で、TA98 は 150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA* では抗菌性は認められなかった。また、S9 mix 添加試験では *S. typhimurium* の 4 菌株はすべて 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA* では抗菌性は認められなかった。

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 50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA 98は 200 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$)、S9 mix 添加試験では 800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (WP2 *uvrA* は 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) とした。

〔本試験〕

2 回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。T B B Cの用量を、S9 mix 無添加試験では TA100, TA1535 および TA1537 は 0.781～50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 は 3.13～200 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は 313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で、S9 mix 添加試験では *S. typhimurium* の 4 菌株は 12.5～800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は 313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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。

T B B C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、4,4'-チオビス (6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール) 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 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) ** 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	95	100	111	16	14	16	24	22	21	25	27	21	10	7	12	
		(102± 8.2)			(15± 1.2)			(22± 1.5)			(24± 3.1)			(10± 2.5)			
	50 #	46 *			5 *			27			21			7 *			
	150 #	60 *			6 *			25			3 *			0 *			
	500 #	72 *			7 *			21			17 *			0 *			
	1500 #	79 *			9 *			24			10 *			0 *			
	5000 #	61 *			3 *			8			0 *			0 *			
S9mix (+)	0	102	93	115	17	17	15	27	21	27	39	24	36	17	14	17	
		(103± 11.1)			(16± 1.2)			(25± 3.5)			(33± 7.9)			(16± 1.7)			
	50	88			10			22			27			14			
	150	64			9			36			22			12			
	500 #	25 *			9 *			28			1 *			0 *			
	1500 #	88 *			3 *			17			2 *			0 *			
	5000 #	89 *			1 *			15			0 *			0 *			
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	542	539	556	312	298	323	130	137	122	613	833	730	648	610	640	
		(546± 9.1)			(311± 12.5)			(130± 7.5)			(725± 110.1)			(633± 20.0)			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1369	1337	1260	323	243	301	1462	1479	1194	415	434	417	323	320	320	
		(1322± 56.0)			(289± 41.3)			(1378± 159.9)			(422± 10.4)			(321± 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. #: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

**: Purity was above 98%.

Table 2-1. Results of reverse mutation test (I) of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) ** 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			TA98			TA1537						
S9mix (-)	0	109	134	119	20	22	11	21	21	30	11	6	13	(121 ± 12.6)	(18 ± 5.9)	(24 ± 5.2)	(10 ± 3.6)
	0.781	104	107	119	16	12	17	ND			7	12	12	(110 ± 7.9)	(15 ± 2.6)		(10 ± 2.9)
	1.56	99	115	109	16	11	14	ND			8	8	5	(108 ± 8.1)	(14 ± 2.5)		(7 ± 1.7)
	3.13	88	111	99	14	10	9	22	25	23	7	15	12	(99 ± 11.5)	(11 ± 2.6)	(23 ± 1.5)	(11 ± 4.0)
	6.25	95	85	101	9	12	14	18	14	25	10	7	6	(94 ± 8.1)	(12 ± 2.5)	(19 ± 5.6)	(8 ± 2.1)
	12.5	95	97	94	9	9	8	22	22	19	5 *	5 *	5 *	(95 ± 1.5)	(9 ± 0.6)	(21 ± 1.7)	(5 ± 0.0)
	25	88 *	84 *	89 *	11 *	5 *	13 *	11	25	19	7 *	8 *	2 *	(87 ± 2.6)	(10 ± 4.2)	(18 ± 7.0)	(6 ± 3.2)
	50 #	69 *	66 *	53 *	7 *	14 *	5 *	13	11	14	3 *	1 *	5 *	(63 ± 8.5)	(9 ± 4.7)	(13 ± 1.5)	(3 ± 2.0)
	100 #							5 *	5 *	9 *						(6 ± 2.3)	
	200 #							0 *	2 *	8 *						(3 ± 4.2)	
S9mix (+)	0	156	139	134	13	14	24	32	32	31	12	15	12	(143 ± 11.5)	(17 ± 6.1)	(32 ± 0.6)	(13 ± 1.7)
	12.5	146	145	161	19	12	18	40	39	40	9	15	13	(151 ± 9.0)	(16 ± 3.8)	(40 ± 0.6)	(12 ± 3.1)
	25	133	141	140	18	17	19	30	41	37	14	13	6	(138 ± 4.4)	(18 ± 1.0)	(36 ± 5.6)	(11 ± 4.4)
	50	137	156	128	12	8	22	38	32	36	17	6	14	(140 ± 14.3)	(14 ± 7.2)	(35 ± 3.1)	(12 ± 5.7)
	100	134	125	120	11	16	15	42	32	33	23	14	19	(126 ± 7.1)	(14 ± 2.6)	(36 ± 5.5)	(19 ± 4.5)
	200	98	99	94	9	20	9	25	17	17	13	19	13	(97 ± 2.6)	(13 ± 6.4)	(20 ± 4.6)	(15 ± 3.5)
	400 #	60	83	74	10 *	10 *	9 *	2	5	2	11	9	6	(72 ± 11.6)	(10 ± 0.6)	(3 ± 1.7)	(9 ± 2.5)
	800 #	46 *	43 *	36 *	5 *	9 *	8 *	2 *	2 *	3 *	1 *	1 *	2 *	(42 ± 5.1)	(7 ± 2.1)	(2 ± 0.6)	(1 ± 0.6)
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			9AA						
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.1			80						
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA						
	Dose (µg /plate)	1			2			0.5			2						
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	868	803	830	170	165	175	894	873	913	1310	1187	1149	(834 ± 32.7)	(170 ± 5.0)	(893 ± 20.0)	(1215 ± 84.2)
	Number of colonies / plate	1352	1209	1238	270	316	300	420	373	374	243	212	142	(1266 ± 75.6)	(295 ± 23.4)	(389 ± 26.9)	(199 ± 51.7)

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. #: Precipitate was observed on the surface of agar plates.
 **: Purity was above 98%. ND : Not done

Table 2-2. Results of reverse mutation test (I) of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) ** 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					
				WP2uvrA			
S9mix (-)	0			20	37	22	
				(26 ± 9.3)			
	313 #			14	13	12	
				(13 ± 1.0)			
	625 #			16	29	18	
				(21 ± 7.0)			
	1250 #			16	22	29	
				(22 ± 6.5)			
S9mix (+)	2500 #			25	24	19	
				(23 ± 3.2)			
	5000 #			22	22	23	
				(22 ± 0.6)			
	0			29	22	24	
				(25 ± 3.6)			
	313 #			29	21	18	
				(23 ± 5.7)			
625 #			20	16	16		
			(17 ± 2.3)				
S9mix (+)	1250 #			24	15	18	
				(19 ± 4.6)			
	2500 #			12	11	11	
				(11 ± 0.6)			
	5000 #			11	11	9	
				(10 ± 1.2)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (µg /plate)			0.01			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose (µg /plate)			10			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate			146	162	170	
				(159 ± 12.2)			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate			1214	1213	1269	
				(1232 ± 32.0)			

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

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was above 98%.

Table 3-1. Results of reverse mutation test (II) of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) ** 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			TA98			TA1537						
S9mix (-)	0	120	130	141	11	12	18	29	18	26	7	12	5	(130± 10.5)	(14 ± 3.8)	(24± 5.7)	(8 ± 3.6)
	0.781	124	135	149	12	10	14	ND			8	12	7	(136 ± 12.5)	(12 ± 2.0)		(9 ± 2.6)
	1.56	151	112	105	20	14	12	ND			6	9	11	(123 ± 24.8)	(15 ± 4.2)		(9 ± 2.5)
	3.13	129	104	132	8	17	19	23	25	29	12	7	5	(122 ± 15.4)	(15 ± 5.9)	(26 ± 3.1)	(8 ± 3.6)
	6.25	114	91	112	15	10	13	12	24	24	5	5	6	(106 ± 12.7)	(13 ± 2.5)	(20 ± 6.9)	(5 ± 0.6)
	12.5	107 *	106 *	84 *	15	15	6	25	19	21	10 *	8 *	12 *	(99 ± 13.0)	(12 ± 5.2)	(22 ± 3.1)	(10 ± 2.0)
	25	64 *	84 *	106 *	6 *	11 *	14 *	17	23	20	5 *	6 *	6 *	(85 ± 21.0)	(10 ± 4.0)	(20 ± 3.0)	(6 ± 0.6)
	50 #	53 *	63 *	48 *	9 *	6 *	9 *	8	14	17	0 *	0 *	2 *	(55 ± 7.6)	(8 ± 1.7)	(13 ± 4.6)	(1 ± 1.2)
	100 #							9 *	5 *	6 *						(7 ± 2.1)	
	200 #							10 *	4 *	6 *						(7 ± 3.1)	
S9mix (+)	0	129	137	129	15	16	20	30	36	36	14	13	14	(132 ± 4.6)	(17 ± 2.6)	(34 ± 3.5)	(14 ± 0.6)
	12.5	172	182	166	20	20	30	33	46	35	8	13	9	(173 ± 8.1)	(23 ± 5.8)	(38 ± 7.0)	(10 ± 2.6)
	25	160	162	174	33	26	23	45	38	39	12	22	8	(165 ± 7.6)	(27 ± 5.1)	(41 ± 3.8)	(14 ± 7.2)
	50	166	168	146	24	15	20	42	41	39	11	10	9	(160 ± 12.2)	(20 ± 4.5)	(41 ± 1.5)	(10 ± 1.0)
	100	120	146	118	17	26	12	29	30	38	14	15	18	(128 ± 15.6)	(18 ± 7.1)	(32 ± 4.9)	(16 ± 2.1)
	200 #	117	114	122	11	16	11	19	14	17	8	12	4	(118 ± 4.0)	(13 ± 2.9)	(17 ± 2.5)	(8 ± 4.0)
	400 #	82 *	95 *	80 *	15	9	10	9	5	7	2 *	9 *	14 *	(86 ± 8.1)	(11 ± 3.2)	(7 ± 2.0)	(8 ± 6.0)
	800 #	45 *	47 *	46 *	9 *	8 *	5 *	3 *	3 *	4 *	0 *	0 *	0 *	(46 ± 1.0)	(7 ± 2.1)	(3 ± 0.6)	(0 ± 0.0)
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			9AA						
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.1			80						
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA						
	Dose (µg /plate)	1			2			0.5			2						
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	794	787	840	172	181	159	932	901	970	942	913	905	(807 ± 28.8)	(171 ± 11.1)	(934 ± 34.6)	(920 ± 19.5)
	Number of colonies / plate	1418	1526	1543	299	297	298	321	299	319	256	270	235	(1496 ± 67.8)	(298 ± 1.0)	(313 ± 12.2)	(254 ± 17.6)

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. #: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was above 98%.

ND : Not done

Table 3-2. Results of reverse mutation test (II) of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) ** on bacteria

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					
				WP2 _{uvrA}			
S9mix (-)	0			27	24	18	(23 \pm 4.6)
	313 #			16	25	17	(19 \pm 4.9)
	625 #			18	22	22	(21 \pm 2.3)
	1250 #			23	24	17	(21 \pm 3.8)
	2500 #			15	22	14	(17 \pm 4.4)
	5000 #			8	5	10	(8 \pm 2.5)
S9mix (+)	0			32	26	39	(32 \pm 6.5)
	313 #			27	33	19	(26 \pm 7.0)
	625 #			26	17	17	(20 \pm 5.2)
	1250 #			22	21	20	(21 \pm 1.0)
	2500 #			13	13	12	(13 \pm 0.6)
	5000 #			12	12	15	(13 \pm 1.7)
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (μg /plate)			0.01			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose (μg /plate)			10			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate			217	195	204	(205 \pm 11.1)
	Number of colonies / plate			1569	1540	1512	(1540 \pm 28.5)

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

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was above 98%.