



4-(1-メチルエチル)アニリン
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	6
結 論	7
特 記 事 項	7
文 献	8
Tables 1~3	

【要 約】

4-(1-メチルエチル) アニリ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 *uvrA* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験とも、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、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験の最高用量を 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として6~7用量を設定して実施した。ただし、TA100 と TA1535 の S9 mix 添加試験では、本試験 I の結果 188 または 93.8 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ まで変異コロニー数が用量依存的に増加したため、本試験 II では最高用量を 188 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に下げて、公比2で6用量を設定した。

その結果、TA100 と TA1535 の S9 mix 添加試験において、変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められたことから、4-(1-メチルエチル) アニリンは、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。

【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-(1-メチルエチル)アニリンについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾により実施した。

この試験は、サルモネラ菌（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²⁾、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³⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素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 添加試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質等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、一部改正平成9年10月31日、環保安第287号、衛生第127号、平成09・10・31基局第2号）および「OECD毒性試験ガイドライン：471」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1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年4月9日に から分与された。

検定菌は -80°C 以下で凍結保存したものを用いた。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異 (*rfa*) およびアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Oxoid Ltd.) を入れたL字型試験管に解凍した菌液を一定量加え、 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。試験に用いた検定菌液の生菌数を Appendix 1 に示した。

〔被 験 物 質〕

4-(1-メチルエチル) アニリン (略称: MEA、CAS No. 99-88-7) は、分子量135.20 の無色液体である。構造式等は Appendix 2 に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99.27 wt% (不純物: 0.32% MIPA、0.10% OIPA) であり、 から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保管した。

MEAは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: TPJ5678、和光純薬工業株) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。

〔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。

AP2 : 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) ロット番号 WTQ0059, 純度98%以上)
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株) ロット番号 DLL3931, 純度98%以上)
9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co. ロット番号 106F06681, 純度97%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 DLH6052, 純度90%以上)

AF2、9AA および 2AA は DMSO に、SA は超純水に溶解したものを -20°C で凍結保存し、解凍後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 Lab.) 0.6 % (B)* L-ヒスチジン 0.5 mM

塩化ナトリウム 0.5 % D-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、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号 : HY2802、1997年10月16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
リン酸水素二ナトリウム	10 g	大洋寒天 (清水食品)	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 を流して固めたものである。

3) S9 mix (1 mL 中下記の成分を含む)

S9**	0.1 mL	NADH	4 μ mol
塩化マグネシウム	8 μ mol	NADPH	4 μ mol
塩化カルシウム	33 μ mol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol		

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットにフェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与を行い、酵素誘導して作製したS9 (キッコーマン(株)、ロット番号 : RAA-370、1997年10月3日製造) を購入し、-80°C で凍結保存し、用時に解凍して用いた。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、いずれも腹腔内投与したものである。肝臓の摘出および S9 の調製は5日目。

〔試験方法〕

プレインキュベーション法により、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 を混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、トッパアガー 2 mL を加えて混和し、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。同時に実施した試験については、溶媒および陽性対照群を共通とした。培養は37°Cで48時間行い、発生した変異コロニー数を目視またはコロニーカウンターを用いて算定した。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、結果の再現性の確認を行った。また、最高用量の被験物質 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ最少グルコース寒天培地上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

〔判定基準〕

結果の判定に統計学的手法は用いないこととした。

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、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、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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。

また、陽性結果が得られた検定菌に関しては、本試験で変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上となった用量について、変異コロニー数の平均値から溶媒対照値を差し引いた値を用量で除して比活性（誘発復帰変異コロニー数/mg）を求めた。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

MEAについて 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3として、試験を実施した (Table 1)。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、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 無添加試験および添加試験とも 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、最高用量を 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として、公比2で6~7用量を設定して本試験Iを実施した (Table 2)。その結果、TA100 と TA1535 の S9 mix 添加試験では、それぞれ 46.9 から 750 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ および 23.4 から 375 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められ、それぞれ 188 および 93.8 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ まで用量依存的に増加した。そこで、これらについては、本試験IIの実施に当たって、最高用量を 188 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に下げて公比2で6用量を設定した (Table 3)。その結果、両検定菌とも用量依存的な変異コロニー数の増加が認められ、46.9 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で溶媒対照値の2倍に達した。

TA100 と TA1535 の S9 mix 無添加試験およびその他の検定菌については、本試験Iと同一用量で本試験IIを実施した (Table 3)。その結果、2回の試験とも溶媒対照値の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。

以上の結果から、MEAは S9 mix 添加条件下で TA100 と TA1535 に復帰突然変異を誘発するものと考えられる。各検定菌の比活性を Appendix 3 に示した。当被験物質の最大比活性は、TA100 の S9 mix 添加試験における 3454.2 (本試験I、46.9 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) で、同一条件下における陽性対照物質2-アミノアントラセンの値 (919000) の約270分の1であった。

一方、MEAは当研究所で本試験と並行して実施されたチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では陰性であった (食薬セ研第9-1939号)。また、MEAの類縁化合物のアニリン⁴⁾ および *m*-トルイジン (食薬セ研第7-227号) は、復帰突然

変異試験で陰性結果が得られている。

MEAについて実施したすべての試験において、用いた最高用量の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験では、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、溶媒対照値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-(1-メチルエチル) アニリンは、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、試験の信頼性に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) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: in "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D.M., Ames, B.N.: Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 3) Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360
- 4) 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, 東京 (1991), pp. 27-28

Table 1. Cytotoxicity of 4-(1-methylethyl) aniline 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	148	150	124	9	12	9	26	25	12	16	14	24	7	10	6	
		(141 ± 14.5)			(10 ± 1.7)			(21 ± 7.8)			(18 ± 5.3)			(8 ± 2.1)			
	50.0	163			10			11			15			8			
	150	159			10			25			19			11			
	500	170			12			29			12			5			
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
S9 mix (+)	0	169	172	144	17	12	14	25	25	19	25	30	35	8	5	7	
		(162 ± 15.4)			(14 ± 2.5)			(23 ± 3.5)			(30 ± 5.0)			(7 ± 1.5)			
	50.0	304			41			38			63			18			
	150	365			31			28			45			12			
	500	368			15			32			35			14			
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			0 *			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	647	674	640	621	643	603	200	196	204	620	619	608	415	410	359	
		(654 ± 18.0)			(622 ± 20.0)			(200 ± 4.0)			(616 ± 6.7)			(395 ± 31.0)			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	999	1127	1090	423	401	350	769	810	736	508	498	536	345	403	369	
		(1072 ± 65.9)			(391 ± 37.4)			(772 ± 37.1)			(514 ± 19.7)			(372 ± 29.1)			

Purity was 99.27wt% and 0.32% MIPA and 0.10% OIPA were contained as impurities.

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. Mutagenicity of 4-(1-methylethyl) aniline on bacteria (I)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	116	131	127	8	11	8	15	30	28	26	20	19	7	7	6	
		(125 ± 7.8)			(9 ± 1.7)			(24 ± 8.1)			(22 ± 3.8)			(7 ± 0.6)			
	46.9	110	141	143	15	9	6	26	23	32	25	18	17	5	4	5	
		(131 ± 18.5)			(10 ± 4.6)			(27 ± 4.6)			(20 ± 4.4)			(5 ± 0.6)			
	93.8	151	147	149	11	10	8	35	23	19	20	19	24	6	8	4	
		(149 ± 2.0)			(10 ± 1.5)			(26 ± 8.3)			(21 ± 2.6)			(6 ± 2.0)			
	188	128	129	128	7	8	9	28	27	28	25	23	29	7	9	10	
		(128 ± 0.6)			(8 ± 1.0)			(28 ± 0.6)			(26 ± 3.1)			(9 ± 1.5)			
375	125	141	141	13	13	7	26	17	21	28	20	20	10	6	10		
	(136 ± 9.2)			(11 ± 3.5)			(21 ± 4.5)			(23 ± 4.6)			(9 ± 2.3)				
750	126 *	128	150	8	8	15	26	29	24	17	11	11	11 *	9 *	4 *		
	(135 ± 13.3)			(10 ± 4.0)			(26 ± 2.5)			(13 ± 3.5)			(8 ± 3.6)				
1500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *		
	(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)				
S9 mix (+)	0	126	152	147	12	14	6	37	28	33	40	32	26	14	10	15	
		(142 ± 13.8)			(11 ± 4.2)			(33 ± 4.5)			(33 ± 7.0)			(13 ± 2.6)			
	23.4	231	272	258	24	25	21	30	38	35	66	47	53	12	12	14	
		(254 ± 20.8)			(23 ± 2.1)			(34 ± 4.0)			(55 ± 9.7)			(13 ± 1.2)			
	46.9	298	312	303	32	29	40	38	32	34	56	46	44	16	6	13	
		(304 ± 7.1)			(34 ± 5.7)			(35 ± 3.1)			(49 ± 6.4)			(12 ± 5.1)			
	93.8	298	308	348	42	37	46	29	33	28	48	47	47	18	18	17	
		(318 ± 26.5)			(42 ± 4.5)			(30 ± 2.6)			(47 ± 0.6)			(18 ± 0.6)			
188	284	350	404	37	36	36	44	33	38	54	40	49	18	14	11		
	(346 ± 60.1)			(36 ± 0.6)			(38 ± 5.5)			(48 ± 7.1)			(14 ± 3.5)				
375	338	331	360	31	32	29	29	41	44	40	29	48	13	18	15		
	(343 ± 15.1)			(31 ± 1.5)			(38 ± 7.9)			(39 ± 9.5)			(15 ± 2.5)				
750	344	319	339	14	13	21	36	42	33	42	55	39	17	20	16		
	(334 ± 13.2)			(16 ± 4.4)			(37 ± 4.6)			(45 ± 8.5)			(18 ± 2.1)				
1500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *		
	(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)				
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	531	569	548	566	654	355	208	212	195	619	601	605	323	400	342	
		(549 ± 19.0)			(525 ± 153.7)			(205 ± 8.9)			(608 ± 9.5)			(355 ± 40.1)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1026	1064	1092	454	467	430	794	762	878	517	535	557	448	418	459	
		(1061 ± 33.1)			(450 ± 18.8)			(811 ± 59.9)			(536 ± 20.0)			(442 ± 21.2)			

Purity was 99.27wt% and 0.32% MIPA and 0.10% OIPA were contained as impurities.

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. Mutagenicity of 4-(1-methylethyl) aniline on bacteria (II)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	145	153	140	7	11	11	15	21	30	26	23	28	17	8	6
		(146 ± 6.6)			(10 ± 2.3)			(22 ± 7.5)			(26 ± 2.5)			(10 ± 5.9)		
	46.9	130	130	143	6	9	9	18	27	20	21	19	16	4	5	4
		(134 ± 7.5)			(8 ± 1.7)			(22 ± 4.7)			(19 ± 2.5)			(4 ± 0.6)		
	93.8	126	150	152	8	8	8	23	18	21	19	23	22	9	6	14
		(143 ± 14.5)			(8 ± 0.0)			(21 ± 2.5)			(21 ± 2.1)			(10 ± 4.0)		
	188	157	141	161	10	11	7	25	28	21	24	24	23	11	11	12
		(153 ± 10.6)			(9 ± 2.1)			(25 ± 3.5)			(24 ± 0.6)			(11 ± 0.6)		
375	157	162	161	14	11	7	23	28	25	17	13	29	9	6	12	
	(160 ± 2.6)			(11 ± 3.5)			(25 ± 2.5)			(20 ± 8.3)			(9 ± 3.0)			
750	145 *	114 *	129 *	16 *	4 *	5 *	17	20	20	4 *	15 *	9 *	3 *	2 *	5 *	
	(129 ± 15.5)			(8 ± 6.7)			(19 ± 1.7)			(9 ± 5.5)			(3 ± 1.5)			
1500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
	(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			
S9 mix (+)	0	143	141	130	16	8	17	29	30	21	27	37	34	8	13	14
		(138 ± 7.0)			(14 ± 4.9)			(27 ± 4.9)			(33 ± 5.1)			(12 ± 3.2)		
	5.86	180	195	233	17	16	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		(203 ± 27.3)			(16 ± 1.0)			ND			ND			ND		
	11.7	255	230	235	28	15	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		(240 ± 13.2)			(22 ± 6.7)			ND			ND			ND		
	23.4	258	292	254	24	25	32	38	23	34	62	41	33	18	12	17
		(268 ± 20.9)			(27 ± 4.4)			(32 ± 7.8)			(45 ± 15.0)			(16 ± 3.2)		
	46.9	308	284	297	35	34	28	39	36	36	41	47	56	13	24	15
		(296 ± 12.0)			(32 ± 3.8)			(37 ± 1.7)			(48 ± 7.5)			(17 ± 5.9)		
93.8	344	279	303	28	30	34	40	32	41	53	43	58	17	20	15	
	(309 ± 32.9)			(31 ± 3.1)			(38 ± 4.9)			(51 ± 7.6)			(17 ± 2.5)			
188	319	288	300	38	37	33	40	31	30	48	34	49	12	13	15	
	(302 ± 15.6)			(36 ± 2.6)			(34 ± 5.5)			(44 ± 8.4)			(13 ± 1.5)			
375	ND	ND	ND	ND	ND	ND	33	39	25	48	43	45	13	14	17	
	ND			ND			(32 ± 7.0)			(45 ± 2.5)			(15 ± 2.1)			
750	ND	ND	ND	ND	ND	ND	28	43	30	47	51	43	14	18	12	
	ND			ND			(34 ± 8.1)			(47 ± 4.0)			(15 ± 3.1)			
1500	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
	ND			ND			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 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	518	565	545	574	556	557	196	200	207	592	586	586	483	460	470
		(543 ± 23.6)			(562 ± 10.1)			(201 ± 5.6)			(588 ± 3.5)			(471 ± 11.5)		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1079	999	1015	438	392	383	727	722	748	459	500	459	317	321	372
		(1031 ± 42.3)			(404 ± 29.5)			(732 ± 13.8)			(473 ± 23.7)			(337 ± 30.7)		

Purity was 99.27wt% and 0.32% MIPA and 0.10% OIPA were contained as impurities.

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.

ND : Not done