



1-クロロブタン
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 |
| 材料および試験方法 | 3 |
| 試験結果および考察 | 6 |
| 参 考 文 献 | 7 |
| Tables 1～4 | |

【要 約】

1-クロロブタンの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施することにより検討した。本被験物質は揮発性が高いため、プレート法で実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、用量設定試験は直接法および代謝活性化法のいずれも、0.5～5000 μg /プレート の用量で、本試験は用量設定試験で抗菌性が認められたことから、直接法および代謝活性化法のいずれも 2.441～78.12 μg /プレート の用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、1-クロロブタンは、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】

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、1-クロロブタンについて、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変異⁽²⁾を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接法と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）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代謝活性化法とからなっている。

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化学品試験法ガイドライン：471, 472に準拠し、化学物質GLP（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。

【材料および試験方法】

〔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日にアメリカ合衆国、
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°C 以下で凍結保存した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (OXOID, B-1674/1) を入れたL字型試験
管に種菌を接種し、 37°C 、11~12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-クロロブタン (CAS No. 109-69-3、以下CBと略) は、分子量 92.57、比重 (25°C) 0.89 の無色透明な液体である。純度 99.7%以上のもの (ロット番号：

不純物：sec-ブチルクロライド 0.3%以下)

を から供与された。被験物質は、使用時まで密栓して冷所に保管した。

CBは、アセトン (ロット番号：DSR 3251、和光純薬工業(株)) を用いて 50 mg/ml にな
るように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用
いた。なお、調製にあたって、純度および比重換算は行わなかった。

CBの本試験に用いた調製検体は秦野研究所に於いて含量測定試験を行った。含量測定
試験は、原則として高濃度溶液および低濃度溶液各3サンプルについて実施するものであ
るが、化学分析条件の検討結果から、低濃度溶液についての測定が不可能となったため最
高濃度 ($781.2\text{ }\mu\text{g/ml}$) および測定可能な中間濃度 ($195.3\text{ }\mu\text{g/ml}$) で行った。その結果、
 $781.2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 溶液の含量は、既定濃度に対し、85.4~86.9%、 $195.3\text{ }\mu\text{g/ml}$ 溶液は、36.3
~58.5% (Appendix 1) と高濃度溶液については基準を満たしていたが、中間濃度溶液に
ついては基準を外れていた。また、各濃度の3サンプル間のばらつきも当研究所の基準を
外れていた。以上の結果が得られた原因は、被験物質が極めて低沸点化合物であり易揮発

性のため、検体調製操作、サンプル採取あるいは分析操作中における揮発と考えられる。

なお、本試験時での含量測定結果からわかるように、最高濃度以外での濃度では、易揮発性のため、既定濃度に必ずしも達しないまま試験を実施した。その場合、多少でもCBと供試菌が接触するために以下の点に注意を払った。すなわち、用時調製後速やかに平板にまいたあと、各平板は、同一濃度毎に各密閉袋に入れ培養することとした。

なお、CBのアセトン溶液中での安定性試験については、サンプル間の測定値のばらつきが大きく、上記の操作法により安定性を確認することは困難と考え、実施しなかった。

[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。

| | | | | |
|------|---------------|-------------------|-----------------|---------|
| AF-2 | : フリルフラマイド | (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% |
| 9-AA | : 9-アミノアクリジン | (Sigma Chem. Co.) | ロット番号 96F05641, | 純度>98% |
| 2-AA | : 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% |

AF-2, 2-AA 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。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

[培地および S9 混液の組成]

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% | ピオチン | 0.5 mM |

* : WP2 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、日清製粉株式会社製の最少寒天培地 (用量設定試験においてはロット番号 : DJ030EH, 1992年 5月14日製造および DJ040IH, 1992年 9月 4日製造、本試験においては、ロット番号 : DJ040IH, 1992年 9月 4日製造および DJ050JH, 1992年 10月12日) 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 | リン酸水素アンモニウムトリウム・4水和物 | 3.5 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 | バクトアガー (Difco) | 15 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 混液 (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 |
| 塩化カルシウム | 33 μmol | 0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4) | 0.5 ml |
| 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-280、1992年7月24日製造および RAA-285、1992年11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ある。

〔試験方法〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

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 (代謝活性化試験においては S9 混液 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アセトン、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表中に示した。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、寒天表面上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、陰性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枚ずつを用いて行い、コロニー数を算定した。コロニー数については、各用量群ごとに、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は追加試験を含め2回、本試験は同一用量について2回実施し、再現性の確認を行った。

なお、用量設定試験および本試験とも、被験物質の揮発性を考慮し、用時調製後速やかに平板上に処理したのち、各平板は、同一濃度ごとにそれぞれ密閉袋に入れ培養した。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性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。

【試験結果および考察】

「材料および試験方法」の項において記載したが、調製検体についての含量試験の結果、低用量群については規定濃度から逸脱した。また、安定性試験は実施しなかった。

〔用量設定試験〕

結果を Tables 1、2 に示した。CBについて、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で試験を公比約3で実施したところ、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において、いずれの処理濃度でも抗菌性が認められた。そこで、2回目の用量設定試験を0.5～50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で実施したところ、直接法、代謝活性化法とも最高用量の50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性を示さなかった。

以上の結果から、本試験における最高用量は、抗菌性の認められる78.12 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。なお、本試験では、直接法、代謝活性化法とも抗菌性を考慮して公比2で6用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Tables 3、4 に示した。CBについて上記の用量範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、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。抗菌性は、最高用量の78.12 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ においてのみ認められた。

CBについて実施した試験において、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、陰性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、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、CBは、本試験の条件下において、変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【参 考 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 bacterial reverse mutation assay with 1-Chlorobutane

| 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 | | | | | | | | | Frameshift type | | | | | | |
| | | TA100 | | | TA1535 | | | WP2uvrA | | | TA98 | | | TA1537 | | | |
| S9Mix (-) | 0 | 103 | 104 | 115 | 13 | 8 | 12 | 26 | 14 | 13 | 29 | 26 | 29 | 8 | 9 | 8 | |
| | | (107 \pm 6.7) | | | (11 \pm 2.6) | | | (18 \pm 7.2) | | | (28 \pm 1.7) | | | (8 \pm 0.6) | | | |
| | 50 | 90 * | | | 9 * | | | 12 * | | | 15 * | | | 6 * | | | |
| | 150 | 89 * | | | 5 * | | | 15 * | | | 22 * | | | 6 * | | | |
| | 500 | 78 * | | | 4 * | | | 10 * | | | 9 * | | | 0 * | | | |
| | 1500 | 64 * | | | 0 * | | | 4 * | | | 5 * | | | 0 * | | | |
| | 5000 | 56 * | | | 0 * | | | 8 * | | | 9 * | | | 0 * | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S9 Mix (+) | 0 | 116 | 107 | 94 | 16 | 16 | 12 | 17 | 16 | 13 | 34 | 35 | 25 | 9 | 10 | 10 | |
| | | (106 \pm 11.1) | | | (15 \pm 2.3) | | | (15 \pm 2.1) | | | (31 \pm 5.5) | | | (10 \pm 0.6) | | | |
| | 50 | 93 * | | | 12 * | | | 16 * | | | 17 * | | | 10 * | | | |
| | 150 | 90 * | | | 13 * | | | 13 * | | | 20 * | | | 2 * | | | |
| | 500 | 52 * | | | 5 * | | | 10 * | | | 18 * | | | 6 * | | | |
| | 1500 | 112 * | | | 2 * | | | 14 * | | | 0 * | | | 3 * | | | |
| | 5000 | 30 * | | | 0 * | | | 5 * | | | 0 * | | | 4 * | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | 492 | 438 | 468 | 211 | 214 | 221 | 186 | 156 | 186 | 628 | 528 | 582 | 2857 | 2973 | 2586 | |
| | | (466 \pm 27.1) | | | (215 \pm 5.1) | | | (176 \pm 17.3) | | | (579 \pm 50.1) | | | (2805 \pm 198.6) | | | |
| Positive control | Chemical | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | |
| | Dose (μg /plate) | 1 | | | 2 | | | 10 | | | 0.5 | | | 2 | | | |
| S9 Mix (+) | Number of colonies / plate | 549 | 562 | 555 | 198 | 159 | 194 | 320 | 368 | 280 | 208 | 138 | 208 | 210 | 186 | 181 | |
| | | (555 \pm 6.5) | | | (184 \pm 21.5) | | | (323 \pm 44.1) | | | (185 \pm 40.4) | | | (192 \pm 15.5) | | | |

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

Table 2. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with 1-Chlorobutane

| 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 | | | | | | | | | Frameshift type | | | | | | |
| | | TA100 | | | TA1535 | | | WP2uvrA | | | TA98 | | | TA1537 | | | |
| S9Mix (-) | 0 | 126 | 94 | 108 | 14 | 14 | 16 | 20 | 25 | 25 | 28 | 24 | 27 | 7 | 8 | 7 | |
| | | (109 \pm 16.0) | | | (15 \pm 1.2) | | | (23 \pm 2.9) | | | (26 \pm 2.1) | | | (7 \pm 0.6) | | | |
| | 0.5 | 113 | | | 8 | | | 15 | | | 26 | | | 2 | | | |
| | 1.5 | 79 | | | 11 | | | 12 | | | 27 | | | 5 | | | |
| | 5 | 79 | | | 17 | | | 11 | | | 23 | | | 4 | | | |
| | 15 | 100 | | | 15 | | | 11 | | | 30 | | | 8 | | | |
| | 50 | 81 | | | 12 | | | 8 | | | 24 | | | 13 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S9Mix (+) | 0 | 117 | 130 | 112 | 9 | 21 | 16 | 29 | 20 | 23 | 37 | 38 | 45 | 6 | 15 | 18 | |
| | | (120 \pm 9.3) | | | (15 \pm 6.0) | | | (24 \pm 4.6) | | | (40 \pm 4.4) | | | (13 \pm 6.2) | | | |
| | 0.5 | 101 | | | 14 | | | 13 | | | 28 | | | 11 | | | |
| | 1.5 | 113 | | | 9 | | | 10 | | | 22 | | | 11 | | | |
| | 5 | 98 | | | 12 | | | 9 | | | 23 | | | 10 | | | |
| | 15 | 103 | | | 7 | | | 19 | | | 30 | | | 10 | | | |
| | 50 | 104 | | | 15 | | | 10 | | | 27 | | | 7 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | 526 | 539 | 577 | 262 | 245 | 237 | 185 | 187 | 161 | 571 | 623 | 645 | 3552 | 3559 | 3851 | |
| | | (547 \pm 26.5) | | | (248 \pm 12.8) | | | (178 \pm 14.5) | | | (613 \pm 38.0) | | | (3654 \pm 170.6) | | | |
| S9 Mix (+) | Number of colonies / plate | 699 | 746 | 781 | 176 | 171 | 181 | 343 | 463 | 421 | 292 | 273 | 280 | 122 | 114 | 115 | |
| | | (742 \pm 41.1) | | | (176 \pm 5.0) | | | (409 \pm 60.9) | | | (282 \pm 9.6) | | | (117 \pm 4.4) | | | |

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

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 1-Chlorobutane

| 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 | | | | | | Frameshift type | | | | | | | | | | | | | |
| | | TA100 | | | TA1535 | | | WP2uvrA | | | TA98 | | | TA1537 | | | | | | | |
| S9Mix (-) | 0 | 117 | 123 | 115 | 16 | 18 | 24 | 11 | 14 | 12 | 22 | 25 | 17 | 6 | 5 | 6 | (118 \pm 4.2) | (19 \pm 4.2) | (12 \pm 1.5) | (21 \pm 4.0) | (6 \pm 0.6) |
| | 2.441 | 112 | 88 | 94 | 16 | 14 | 14 | 16 | 13 | 15 | 27 | 20 | 18 | 7 | 5 | 6 | (98 \pm 12.5) | (15 \pm 1.2) | (15 \pm 1.5) | (22 \pm 4.7) | (6 \pm 1.0) |
| | 4.882 | 95 | 95 | 99 | 14 | 16 | 21 | 13 | 17 | 17 | 20 | 19 | 21 | 11 | 6 | 7 | (96 \pm 2.3) | (17 \pm 3.6) | (16 \pm 2.3) | (20 \pm 1.0) | (8 \pm 2.6) |
| | 9.765 | 89 | 89 | 86 | 18 | 14 | 13 | 14 | 22 | 17 | 18 | 22 | 19 | 5 | 7 | 7 | (88 \pm 1.7) | (15 \pm 2.6) | (18 \pm 4.0) | (20 \pm 2.1) | (6 \pm 1.2) |
| | 19.53 | 91 | 93 | 83 | 13 | 15 | 9 | 17 | 16 | 23 | 22 | 17 | 18 | 10 | 5 | 12 | (89 \pm 5.3) | (12 \pm 3.1) | (19 \pm 3.8) | (19 \pm 2.6) | (9 \pm 3.6) |
| | 39.06 | 102 | 89 | 88 | 14 | 15 | 14 | 14 | 8 | 16 | 23 | 19 | 20 | 6 | 6 | 7 | (93 \pm 7.8) | (14 \pm 0.6) | (13 \pm 4.2) | (21 \pm 2.1) | (6 \pm 0.6) |
| | 78.12 | 66 * | 71 * | 59 * | 18 * | 15 * | 16 * | 11 * | 9 * | 12 * | 14 * | 18 * | 21 * | 6 * | 6 * | 11 * | (65 \pm 6.0) | (16 \pm 1.5) | (11 \pm 1.5) | (18 \pm 3.5) | (8 \pm 2.9) |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ix (+) | 0 | 123 | 113 | 125 | 17 | 12 | 18 | 12 | 18 | 12 | 27 | 28 | 29 | 13 | 13 | 11 | (120 \pm 6.4) | (16 \pm 3.2) | (14 \pm 3.5) | (28 \pm 1.0) | (12 \pm 1.2) |
| | 2.441 | 96 | 99 | 98 | 18 | 11 | 21 | 18 | 9 | 15 | 28 | 29 | 30 | 19 | 18 | 19 | (98 \pm 1.5) | (17 \pm 5.1) | (14 \pm 4.6) | (29 \pm 1.0) | (19 \pm 0.6) |
| | 4.882 | 102 | 99 | 99 | 21 | 16 | 16 | 14 | 17 | 13 | 38 | 28 | 26 | 23 | 15 | 16 | (100 \pm 1.7) | (18 \pm 2.9) | (15 \pm 2.1) | (31 \pm 6.4) | (18 \pm 4.4) |
| | 9.765 | 105 | 111 | 104 | 16 | 21 | 13 | 13 | 11 | 14 | 27 | 32 | 26 | 11 | 20 | 18 | (107 \pm 3.8) | (17 \pm 4.0) | (13 \pm 1.5) | (28 \pm 3.2) | (16 \pm 4.7) |
| | 19.53 | 96 | 102 | 96 | 17 | 9 | 13 | 13 | 14 | 11 | 28 | 30 | 32 | 12 | 12 | 20 | (98 \pm 3.5) | (13 \pm 4.0) | (13 \pm 1.5) | (30 \pm 2.0) | (15 \pm 4.6) |
| | 39.06 | 108 | 112 | 96 | 20 | 10 | 21 | 12 | 6 | 14 | 25 | 27 | 21 | 11 | 21 | 15 | (105 \pm 8.3) | (17 \pm 6.1) | (11 \pm 4.2) | (24 \pm 3.1) | (16 \pm 5.0) |
| | 78.12 | 67 * | 64 * | 64 * | 22 * | 9 * | 14 * | 9 * | 13 * | 11 * | 18 * | 18 * | 17 * | 13 * | 11 * | 10 * | (65 \pm 1.7) | (15 \pm 6.6) | (11 \pm 2.0) | (18 \pm 0.6) | (11 \pm 1.5) |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | 609 | 641 | 675 | 264 | 260 | 279 | 124 | 115 | 130 | 227 | 254 | 205 | 2561 | 2298 | 2525 | (642 \pm 33.0) | (268 \pm 10.0) | (123 \pm 7.5) | (229 \pm 24.5) | (2461 \pm 142.6) |
| | Number of colonies / plate | 694 | 648 | 666 | 215 | 187 | 173 | 536 | 615 | 645 | 162 | 129 | 114 | 247 | 205 | 227 | (669 \pm 23.2) | (192 \pm 21.4) | (599 \pm 56.3) | (135 \pm 24.6) | (226 \pm 21.0) |

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

Table 4. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 1-Chlorobutane

| 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 | | | | | | | |
| S9 Mix (-) | 0 | 122 | 124 | 128 | 13 | 10 | 10 | 21 | 19 | 24 | 23 | 22 | 24 | 10 | 12 | 9 | (125 \pm 3.1) | (11 \pm 1.7) | (21 \pm 2.5) | (23 \pm 1.0) | (10 \pm 1.5) |
| | 2.441 | 110 | 129 | 119 | 8 | 9 | 12 | 14 | 30 | 29 | 25 | 31 | 25 | 5 | 10 | 11 | (119 \pm 9.5) | (10 \pm 2.1) | (24 \pm 9.0) | (27 \pm 3.5) | (9 \pm 3.2) |
| | 4.882 | 110 | 151 | 110 | 6 | 7 | 7 | 23 | 26 | 18 | 17 | 28 | 21 | 8 | 7 | 13 | (124 \pm 23.7) | (7 \pm 0.6) | (22 \pm 4.0) | (22 \pm 5.6) | (9 \pm 3.2) |
| | 9.765 | 109 | 108 | 117 | 9 | 9 | 7 | 19 | 12 | 20 | 27 | 25 | 27 | 13 | 12 | 11 | (111 \pm 4.9) | (8 \pm 1.2) | (17 \pm 4.4) | (26 \pm 1.2) | (12 \pm 1.0) |
| | 19.53 | 131 | 125 | 99 | 7 | 9 | 9 | 21 | 30 | 27 | 32 | 26 | 29 | 12 | 2 | 10 | (118 \pm 17.0) | (8 \pm 1.2) | (26 \pm 4.6) | (29 \pm 3.0) | (8 \pm 5.3) |
| | 39.06 | 146 | 127 | 126 | 5 | 9 | 10 | 19 | 18 | 17 | 25 | 31 | 34 | 6 | 8 | 8 | (133 \pm 11.3) | (8 \pm 2.6) | (18 \pm 1.0) | (30 \pm 4.6) | (7 \pm 1.2) |
| | 78.12 | 116 * | 114 * | 127 * | 8 * | 7 * | 10 * | 12 * | 13 * | 15 * | 29 * | 33 * | 26 * | 6 * | 5 * | 7 * | (119 \pm 7.0) | (8 \pm 1.5) | (13 \pm 1.5) | (29 \pm 3.5) | (6 \pm 1.0) |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S9 Mix (+) | 0 | 118 | 124 | 112 | 9 | 11 | 11 | 18 | 16 | 23 | 29 | 27 | 30 | 9 | 9 | 19 | (118 \pm 6.0) | (10 \pm 1.2) | (19 \pm 3.6) | (29 \pm 1.5) | (12 \pm 5.8) |
| | 2.441 | 98 | 110 | 111 | 9 | 6 | 6 | 28 | 22 | 16 | 27 | 30 | 23 | 12 | 10 | 11 | (106 \pm 7.2) | (7 \pm 1.7) | (22 \pm 6.0) | (27 \pm 3.5) | (11 \pm 1.0) |
| | 4.882 | 98 | 128 | 116 | 9 | 9 | 3 | 22 | 21 | 23 | 30 | 31 | 27 | 7 | 4 | 8 | (114 \pm 15.1) | (7 \pm 3.5) | (22 \pm 1.0) | (29 \pm 2.1) | (6 \pm 2.1) |
| | 9.765 | 122 | 107 | 107 | 11 | 5 | 6 | 20 | 18 | 18 | 21 | 25 | 28 | 12 | 13 | 5 | (112 \pm 8.7) | (7 \pm 3.2) | (19 \pm 1.2) | (25 \pm 3.5) | (10 \pm 4.4) |
| | 19.53 | 112 | 106 | 98 | 5 | 10 | 9 | 25 | 19 | 18 | 36 | 30 | 34 | 11 | 9 | 5 | (105 \pm 7.0) | (8 \pm 2.6) | (21 \pm 3.8) | (33 \pm 3.1) | (8 \pm 3.1) |
| | 39.06 | 113 | 115 | 118 | 8 | 8 | 10 | 9 | 20 | 20 | 29 | 23 | 22 | 16 | 8 | 8 | (115 \pm 2.5) | (9 \pm 1.2) | (16 \pm 6.4) | (25 \pm 3.8) | (11 \pm 4.6) |
| | 78.12 | 93 * | 108 * | 101 * | 7 * | 8 * | 7 * | 16 * | 25 * | 21 * | 23 * | 42 * | 29 * | 7 * | 7 * | 8 * | (101 \pm 7.5) | (7 \pm 0.6) | (21 \pm 4.5) | (31 \pm 9.7) | (7 \pm 0.6) |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | | | | | | | |
| | Number of colonies / plate | 702 | 691 | 723 | 127 | 138 | 140 | 207 | 231 | 244 | 256 | 313 | 264 | 2740 | 2505 | 2846 | (705 \pm 16.3) | (135 \pm 7.0) | (227 \pm 18.8) | (278 \pm 30.9) | (2697 \pm 174.5) |
| | Number of colonies / plate | 1004 | 1059 | 978 | 194 | 172 | 184 | 481 | 550 | 597 | 501 | 517 | 492 | 347 | 326 | 361 | (1014 \pm 41.4) | (183 \pm 11.0) | (543 \pm 58.3) | (503 \pm 12.7) | (345 \pm 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. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.