1，3－イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチル
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	7
特　記　事　項	8
文　　献	8
Tables　1～3	

【要　　約】

1,3-イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチ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 μg/プレート の用量で行ったところ、S9 mix 無添加試験では 1500 μg/プレート 以上（WP2 *uvrA* は 5000 μg/プレート）で、S9 mix 添加試験では TA100 および TA1537 において 5000 μg/プレート で抗菌性が認められた。したがって、本試験は S9 mix 無添加試験の最高用量を 2000 μg/プレート（WP2 *uvrA* は 5000 μg/プレート）、S9 mix 添加試験の最高用量を 5000 μg/プレート として、公比２で５～７用量を設定して実施した。

その結果、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倍以上となる再現性のあ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、1,3-イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチルは、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、1,3-イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチルについて、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（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, 4]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

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℃以下で凍結保存したものを用い、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）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℃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〕

1,3-イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチル（略称：THMBF、CAS No. 11070-44-3）は、分子量 166.18 の淡黄色透明液体（受領時：無色透明液体）である。構造式等は Appendix に示した。用いた被験物質は、ロット番号　　純度 99.97 wt%（異性体の混合物として、不純物：0.01% メチルテトラヒドロフタル酸、0.02% 無水マレイン酸）であり、　　から供与された。被験物質は、使用時まで密封、遮光して冷蔵した。なお、試験終了後に　　において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 99.13 wt% であった。

ＴＨＭＢＦは、ジメチルスルホキシド（DMSO、ロット番号：ESK4546、和光純薬工業㈱）に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、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。

〔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)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	(上野製薬㈱	ﾛｯﾄ番号 46,	純度99.9%)
SA	: ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度90%以上)
9AA	: 9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	(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㈱	ﾛｯﾄ番号 DSF2950,	純度90%以上)

AF2 および 2AA は DMSO（和光純薬工業㈱）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) ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco)	0.6%	(B)* L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5%	D-ﾋﾞｵﾁﾝ	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㈱製の最少寒天培地（ロット番号：HY0302、1995年９月29日製造）を用いた。なお、培地１ℓあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ・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	ｸﾞﾙｺｰｽ	20 g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10 g	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (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 ㎖中下記の成分を含む）

S9**	0.1 ㎖	NADH	4 μmol
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	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
ｸﾞﾙｺｰｽ-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㈱、ロット番号 RAA-338、1995年12月15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 ㎖、リン酸緩衝液 0.5 ㎖（S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ㎖）、検定菌液 0.1 ㎖ を混合し、37℃で20分間往復振とう培養したのち、トップアガー2㎖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。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。培養は37℃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。ただし、2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が10以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とすることとした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

ＴＨＭＢＦについて 50.0～5000 μg/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、S9 mix 無添加試験では 1500 μg/プレート 以上（WP2 *uvrA* は 5000 μg/プレート）で、S9 mix 添加試験では TA100 および TA1537 において 5000 μg/プレート 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 2000 μg/プレート（WP2 *uvrA* は 5000 μg/プレート）、S9 mix 添加試験では 5000 μg/プレート とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験でともに、上記の最高用量に基づいて公比２で５～７用量を設定して２回の本試験を実施した（Table ２、３）。その結果、いずれの検定菌においても、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。

ＴＨＭＢＦ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、1,3-イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチルは、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) 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.: Mutat. Res. 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) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984) pp. 161-187

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione 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 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	85 104 112 (100 ± 13.9)	9 6 7 (7 ± 1.5)	10 24 14 (16 ± 7.2)	19 15 19 (18 ± 2.3)	9 5 7 (7 ± 2.0)	
	50.0	97	11	20	33	12	
	150	126	13	20	34	16	
	500	124	3	30	27	18	
	1500	83 *	6 *	28	15 *	1 *	
	5000	0 *	0 *	5 *	0 *	0 *	
S9mix (+)	0	104 117 115 (112 ± 7.0)	9 13 21 (14 ± 6.1)	24 33 31 (29 ± 4.7)	27 27 34 (29 ± 4.0)	14 14 17 (15 ± 1.7)	
	50.0	119	9	17	35	12	
	150	112	9	24	28	10	
	500	119	10	29	20	20	
	1500	123	14	29	24	8	
	5000	121 *	8	27	24	11 *	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	540 601 593 (578 ± 33.2)	374 368 357 (366 ± 8.6)	343 330 341 (338 ± 7.0)	651 641 669 (654 ± 14.2)	622 621 787 (677 ± 95.6)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	600 705 796 (700 ± 98.1)	303 298 337 (313 ± 21.2)	616 613 594 (608 ± 11.9)	324 305 312 (314 ± 9.6)	333 294 315 (314 ± 19.5)	

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.

Purity was 99.97 wt% as a mixture of isomers and 0.01% methyltetrahydrophthalate and 0.02 % maleic anhydride were contained as impurities.

Table 2-1. Results of reverse mutation test (I) of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione 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 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	130 121 124 (125 ± 4.6)	6 4 8 (6 ± 2.0)		28 16 23 (22 ± 6.0)	10 7 9 (9 ± 1.5)	
	31.3	ND	11 6 11 (9 ± 2.9)		ND	ND	
	62.5	104 113 119 (112 ± 7.5)	10 8 13 (10 ± 2.5)		24 22 21 (22 ± 1.5)	5 7 10 (7 ± 2.5)	
	125	130 104 115 (116 ± 13.1)	10 8 7 (8 ± 1.5)		23 33 21 (26 ± 6.4)	5 4 7 (5 ± 1.5)	
	250	112 114 132 (119 ± 11.0)	6 11 15 (11 ± 4.5)		28 21 22 (24 ± 3.8)	6 6 6 (6 ± 0.0)	
	500	104 115 101 (107 ± 7.4)	0 * 0 * 5 * (2 ± 2.9)		35 24 34 (31 ± 6.1)	15 14 5 (11 ± 5.5)	
	1000	75 * 72 * 59 * (69 ± 8.5)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)		22 * 13 * 26 * (20 ± 6.7)	6 * 3 * 4 * (4 ± 1.5)	
	2000	51 * 60 * 36 * (49 ± 12.1)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)		8 * 4 * 0 * (4 ± 4.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
S9mix (+)	0	121 130 134 (128 ± 6.7)	12 9 17 (13 ± 4.0)	27 23 35 (28 ± 6.1)	28 25 32 (28 ± 3.5)	11 17 18 (15 ± 3.8)	
	156	137 144 130 (137 ± 7.0)	ND	ND	ND	16 18 18 (17 ± 1.2)	
	313	151 129 157 (146 ± 14.7)	12 13 12 (12 ± 0.6)	28 31 26 (28 ± 2.5)	25 25 26 (25 ± 0.6)	10 22 27 (20 ± 8.7)	
	625	130 123 134 (129 ± 5.6)	17 8 14 (13 ± 4.6)	29 26 24 (26 ± 2.5)	16 35 28 (26 ± 9.6)	18 19 17 (18 ± 1.0)	
	1250	111 115 123 (116 ± 6.1)	10 20 10 (13 ± 5.8)	20 30 32 (27 ± 6.4)	21 23 15 (20 ± 4.2)	12 22 27 (20 ± 7.6)	
	2500	134 138 124 (132 ± 7.2)	11 7 8 (9 ± 2.1)	26 31 33 (30 ± 3.6)	18 27 21 (22 ± 4.6)	18 15 23 (19 ± 4.0)	
	5000	113 124 116 (118 ± 5.7)	10 7 4 (7 ± 3.0)	25 24 23 (24 ± 1.0)	31 27 30 (29 ± 2.1)	15 13 9 (12 ± 3.1)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA		AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5		0.1	80	
	Number of colonies / plate	697 690 730 (706 ± 21.4)	322 347 336 (335 ± 12.5)		629 620 602 (617 ± 13.7)	691 786 623 (700 ± 81.9)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	871 800 846 (839 ± 36.0)	327 277 315 (306 ± 26.1)	592 609 599 (600 ± 8.5)	289 330 372 (330 ± 41.5)	260 311 302 (291 ± 27.2)	

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 99.97 wt% as a mixture of isomers and 0.01% methyltetrahydrophthalate and 0.02 % maleic anhydride were contained as impurities. ND : Not done

Table 2-2. Results of reverse mutation test (I) of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione 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					
				WP2 *uvrA*			
	0			24 16 33 (24 ± 8.5)			
	156			20 20 27 (22 ± 4.0)			
	313			18 24 27 (23 ± 4.6)			
	625			25 22 24 (24 ± 1.5)			
S9mix	1250			21 18 20 (20 ± 1.5)			
(-)	2500			20 23 19 (21 ± 2.1)			
	5000			6 * 4 * 2 * (4 ± 2.0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (μg /plate)			0.01			
	Number of colonies / plate			226 274 270 (257 ± 26.6)			

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.97 wt% as a mixture of isomers and 0.01% methyltetrahydrophthalate and 0.02 % maleic anhydride were contained as impurities.

Table 3-1. Results of reverse mutation test (II) of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione 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 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	119 120 112 (117 ± 4.4)	11 13 7 (10 ± 3.1)		23 28 21 (24 ± 3.6)	13 12 15 (13 ± 1.5)	
	62.5	123 110 117 (117 ± 6.5)	7 18 13 (13 ± 5.5)		31 24 27 (27 ± 3.5)	13 11 12 (12 ± 1.0)	
	125	104 101 123 (109 ± 11.9)	9 12 12 (11 ± 1.7)		21 16 34 (24 ± 9.3)	15 7 9 (10 ± 4.2)	
	250	129 127 107 (121 ± 12.2)	8 8 8 (8 ± 0.0)		24 22 20 (22 ± 2.0)	12 16 9 (12 ± 3.5)	
	500	130 125 109 (121 ± 11.0)	3 6 9 (6 ± 3.0)		31 29 24 (28 ± 3.6)	20 10 10 (13 ± 5.8)	
	1000	74 * 91 * 49 * (71 ± 21.1)	4 * 3 * 0 * (2 ± 2.1)		0 * 12 * 12 * (8 ± 6.9)	2 * 2 * 0 * (1 ± 1.2)	
	2000	0 * 62 * 60 * (41 ± 35.2)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)		0 * 3 * 5 * (3 ± 2.5)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
S9mix (+)	0	130 101 148 (126 ± 23.7)	12 6 10 (9 ± 3.1)	18 28 26 (24 ± 5.3)	32 33 33 (33 ± 0.6)	15 18 15 (16 ± 1.7)	
	313	150 113 152 (138 ± 22.0)	12 4 4 (7 ± 4.6)	32 31 26 (30 ± 3.2)	32 25 26 (28 ± 3.8)	14 17 15 (15 ± 1.5)	
	625	121 123 132 (125 ± 5.9)	13 12 7 (11 ± 3.2)	32 20 32 (28 ± 6.9)	26 28 36 (30 ± 5.3)	9 12 12 (11 ± 1.7)	
	1250	125 135 129 (130 ± 5.0)	11 8 4 (8 ± 3.5)	23 26 22 (24 ± 2.1)	22 21 28 (24 ± 3.8)	11 13 17 (14 ± 3.1)	
	2500	128 104 105 (112 ± 13.6)	7 10 10 (9 ± 1.7)	29 21 30 (27 ± 4.9)	22 27 28 (26 ± 3.2)	10 11 17 (13 ± 3.8)	
	5000	101 * 89 * 92 * (94 ± 6.2)	5 8 9 (7 ± 2.1)	11 26 34 (24 ± 11.7)	21 21 21 (21 ± 0.0)	8 11 8 (9 ± 1.7)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA		AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5		0.1	80	
	Number of colonies / plate	470 736 677 (628 ± 139.7)	286 284 287 (286 ± 1.5)		378 420 329 (376 ± 45.5)	673 1380 1318 (1124 ± 391.5)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	624 753 841 (739 ± 109.1)	322 276 278 (292 ± 26.0)	677 668 661 (669 ± 8.0)	287 271 289 (282 ± 9.9)	241 223 268 (244 ± 22.6)	

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.

Purity was 99.97 wt% as a mixture of isomers and 0.01% methyltetrahydrophthalate and 0.02 % maleic anhydride were contained as impurities.

Table 3-2. Results of reverse mutation test (II) of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione 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					
				WP2 *uvrA*			
S9mix (-)	0			25 24 20 (23 ± 2.6)			
	156			19 19 25 (21 ± 3.5)			
	313			16 15 20 (17 ± 2.6)			
	625			15 27 14 (19 ± 7.2)			
	1250			26 23 24 (24 ± 1.5)			
	2500			3 * 4 * 2 * (3 ± 1.0)			
	5000			0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (μg /plate)			0.01			
	Number of colonies / plate			291 295 240 (275 ± 30.7)			

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.97 wt% as a mixture of isomers and 0.01% methyltetrahydrophthalate and 0.02 % maleic anhydride were contained as impurities.