

ドデカン酸メチルエステルの
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】

ドデカン酸メチルエステ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、WP2 *uvrA* ではすべての用量で抗菌性が認められなかったのに対して、*S. typhimurium* の4菌株では、S9 mix 無添加ではすべての用量で、S9 mix 添加ではTA1537は150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA100, TA1535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。本試験においてWP2 *uvrA* はS9 mix 無添加、添加のいずれも313~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、その他の4菌株はS9 mix 無添加試験を1.56~50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA100, TA1537)、6.25~200 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1535, TA98)、S9 mix 添加試験を12.5~400 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1537)、25~800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA100, TA1535)、50~1600 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA98) の範囲で用量を設定し、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、ドデカン酸メチルエステルは、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】

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、ドデカン酸メチルエステルについて、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。

【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〕

ドデカン酸メチルエステル (MD、CAS No. 111-82-0) は、分子量 214.35 の無色透明の液体である。構造式等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は
の
ロット番号
純度 98% (不純物：不明) のものを購入した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

MDは、アセトン (ロット番号：DSM4173、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。

MDのアセトン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 ($31.3\text{ }\mu\text{g/ml}$) 溶液は当該試験の本試験Ⅱで調製したものについて、また高濃度 (420 mg/ml) 溶液は当研究所で実施した染色体異常試験 (G-94-020) で調製したものについて、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、103および 101%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、低濃度溶液の含量は基準値（溶媒中での平均含量が添加量の90～110%）をやや下まわった（Appendix 4）。しかしながら、各菌株ごとの用量依存性は十分確認できるため結果の判定に影響をおよぼすものではないと判断した。

〔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-アミノアクリジン (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 はジメチルスルホキシド（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%	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 DJ040KJ、1994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
リン酸水素二カリウム	10 g	バクタアガー (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。MDについて 50～5000 μg /プレート の範囲で公比を約 3 として、試験を実施したところ、WP2 *uvrA* は S9 mix 無添加、添加のいずれにおいても抗菌性は認められなかったのに対し、その他の 4 菌株は S9 mix 無添加試験では全ての用量で、S9 mix 添加試験ではそれぞれ TA1537 が 150 μg /プレート、TA100 と TA1535 が 500 μg /プレート、TA98 は 1500 μg /プレート 以上の用量で抗菌性が認められた。

本試験における最高用量はそれぞれ 1 プレートあたり、WP2 *uvrA* は S9 mix の添加の有無にかかわらず 5000 μg 、その他の 4 菌株については、S9 mix 無添加試験では TA100 と TA1537 は 50 μg 、TA1535 と TA98 は 200 μg とし、S9 mix 添加試験では TA1537 は 400 μg 、TA100 および TA1535 は 800 μg 、TA98 は 1600 μg とした。

〔本試験〕

2 回の本試験の結果をそれぞれ Table 2-1～3-2 に示した。MDの用量を、WP2 *uvrA* では S9 mix 無添加、添加のいずれも 313～5000 μg /プレート、*S. typhimurium* では、いずれも 1 プレートあたり、S9 mix 無添加試験では TA100 と TA1537 で 1.56～50 μg 、TA1535 と TA98 で 6.25～200 μg 、S9 mix 添加試験では TA1537 で 12.5～400 μg 、TA100 と TA1535 で 25～800 μg 、TA98 で 50～1600 μg の範囲で公比を 2 とし WP2 *uvrA* は 5 用量、その他は 6 用量を設定して試験を実施した。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。

MD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、ドデカン酸メチルエステルは、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 methyl dodecanoate ** 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	97	103	80	9	7	12	32	33	38	22	28	24	7	13	8	
		(93 ± 11.9)			(9 ± 2.5)			(34 ± 3.2)			(25 ± 3.1)			(9 ± 3.2)			
	50	81 *			5 *			18			33 *			4 *			
	150	74 *			3 *			21			29 *			4 *			
	500	83 *			6 *			32			12 *			7 *			
	1500	81 *			8 *			22			14 *			0 *			
	5000	73 *			9 *			12			11 *			0 *			
S9mix (+)	0	90	116	138	9	24	14	39	35	19	38	35	32	15	18	21	
		(115 ± 24.0)			(16 ± 7.6)			(31 ± 10.6)			(35 ± 3.0)			(18 ± 3.0)			
	50	85			7			38			26			11			
	150	82			5			18			28			15 *			
	500	57 *			13 *			31			24			7 *			
	1500	44 *			8 *			27			15 *			0 *			
	5000	27 *			0 *			21			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	451	557	477	308	292	250	146	123	118	686	670	745	835	1053	1077	
		(495 ± 55.2)			(283 ± 30.0)			(129 ± 14.9)			(700 ± 39.5)			(988 ± 133.3)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1144	1310	1219	333	240	272	1467	1476	1419	512	480	518	244	228	208	
		(1224 ± 83.1)			(282 ± 47.2)			(1454 ± 30.6)			(503 ± 20.4)			(227 ± 18.0)			

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.

** : Purity was 98% and impurity was unknown.

Table 2-1. Results of reverse mutation test (I) of methyl dodecanoate ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mea \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type						Frameshift type									
		TA100			TA1535			TA98			TA1537						
S9mix (-)	0	96	111	91	11	13	8	17	16	24	6	10	5	(99 \pm 10.4)	(11 \pm 2.5)	(19 \pm 4.4)	(7 \pm 2.6)
	1.56	115	100	105	ND			ND			7	14	7	(107 \pm 7.6)			(9 \pm 4.0)
	3.13	104	127	90	ND			ND			9	8	6	(107 \pm 18.7)			(8 \pm 1.5)
	6.25	96	95	95	8	8	9	15	20	17	6	6	4	(95 \pm 0.6)	(8 \pm 0.6)	(17 \pm 2.5)	(5 \pm 1.2)
	12.5	96	103	100	19	12	4	11	14	15	5	6	10	(100 \pm 3.5)	(12 \pm 7.5)	(13 \pm 2.1)	(7 \pm 2.6)
	25	82 *	87 *	90 *	10	11	9	22	17	19	4	9	7	(86 \pm 4.0)	(10 \pm 1.0)	(19 \pm 2.5)	(7 \pm 2.5)
	50	64 *	70 *	82 *	9	13	16	16	21	21	4 *	6 *	9 *	(72 \pm 9.2)	(13 \pm 3.5)	(19 \pm 2.9)	(6 \pm 2.5)
	100				7	15	10	25	21	21					(11 \pm 4.0)	(22 \pm 2.3)	
	200				12 *	12 *	10 *	19 *	22 *	21 *					(11 \pm 1.2)	(21 \pm 1.5)	
S9mix (+)	0	107	125	125	16	19	9	25	32	28	12	13	9	(119 \pm 10.4)	(15 \pm 5.1)	(28 \pm 3.5)	(11 \pm 2.1)
	12.5	ND			ND			ND			12	16	16				(15 \pm 2.3)
	25	108	142	134	13	12	12	ND			9	15	9	(128 \pm 17.8)	(12 \pm 0.6)		(11 \pm 3.5)
	50	138	144	127	13	20	14	34	27	35	10	6	8	(136 \pm 8.6)	(16 \pm 3.8)	(32 \pm 4.4)	(8 \pm 2.0)
	100	142	126	99	15	14	19	29	29	30	10	7	15	(122 \pm 21.7)	(16 \pm 2.6)	(29 \pm 0.6)	(11 \pm 4.0)
	200	78	111	96	5	10	14	27	24	28	19	16	15	(95 \pm 16.5)	(10 \pm 4.5)	(26 \pm 2.1)	(17 \pm 2.1)
	400	98	128	135	12	11	13	27	31	18	5 *	5 *	10 *	(120 \pm 19.7)	(12 \pm 1.0)	(25 \pm 6.7)	(7 \pm 2.9)
	800	80 *	66 *	75 *	9 *	9 *	9 *	26	29	26				(74 \pm 7.1)	(9 \pm 0.0)	(27 \pm 1.7)	
	1600							22 *	20 *	13 *						(18 \pm 4.7)	
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	499	483	527	193	193	206	735	788	820	798	714	804	(503 \pm 22.3)	(197 \pm 7.5)	(781 \pm 42.9)	(772 \pm 50.3)
	Number of colonies / plate	1091	1292	1423	326	304	322	438	455	387	252	243	261	(1269 \pm 167.2)	(317 \pm 11.7)	(427 \pm 35.4)	(252 \pm 9.0)

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.

** : Purity was 98% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 2-2. Results of reverse mutation test (I) of methyl dodecanoate ** 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					
				WP2uvrA			
S9mix (-)	0			20 21 22 (21 \pm 1.0)			
	313			26 29 24 (26 \pm 2.5)			
	625			27 30 29 (29 \pm 1.5)			
	1250			22 26 27 (25 \pm 2.6)			
	2500			23 33 27 (28 \pm 5.0)			
	5000			27 27 21 (25 \pm 3.5)			
S9mix (+)	0			23 24 28 (25 \pm 2.6)			
	313			20 28 30 (26 \pm 5.3)			
	625			24 34 37 (32 \pm 6.8)			
	1250			28 42 40 (37 \pm 7.6)			
	2500			24 24 30 (26 \pm 3.5)			
	5000			26 12 20 (19 \pm 7.0)			
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			107 100 111 (106 \pm 5.6)			
	Number of colonies / plate			1391 1251 1387 (1343 \pm 79.7)			

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

** : Purity was 98% and impurity was unknown.

Table 3-1. Results of reverse mutation test (II) of methyl dodecanoate ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, M± S.D.)															
		Base - pair substitution type						Frameshift type									
		TA100			TA1535			TA98			TA1537						
S9mix (-)	0	124	106	135	10	11	15	24	28	20	9	3	12	(122 ± 14.6)	(12 ± 2.6)	(24 ± 4.0)	(8 ± 4.6)
	1.56	141	150	134	ND			ND			14	10	6	(142 ± 8.0)			(10 ± 4.0)
	3.13	143	156	110	ND			ND			8	12	14	(136 ± 23.7)			(11 ± 3.1)
	6.25	112	117	107	17	15	18	22	19	17	6	14	9	(112 ± 5.0)	(17 ± 1.5)	(19 ± 2.5)	(10 ± 4.0)
	12.5	128	114	103	16	20	12	17	24	18	4	9	7	(115 ± 12.5)	(16 ± 4.0)	(20 ± 3.8)	(7 ± 2.5)
	25	137 *	116 *	133 *	9	15	9	24	16	22	9 *	5 *	11 *	(129 ± 11.2)	(11 ± 3.5)	(21 ± 4.2)	(8 ± 3.1)
	50	98 *	102 *	125 *	9	13	11	20	16	15	4 *	7 *	11 *	(108 ± 14.6)	(11 ± 2.0)	(17 ± 2.6)	(7 ± 3.5)
	100				12 *	13 *	10 *	19	16	20					(12 ± 1.5)	(18 ± 2.1)	
	200				12 *	12 *	18 *	17 *	24 *	20 *					(14 ± 3.5)	(20 ± 3.5)	
S9mix (+)	0	138	130	126	9	13	12	26	25	41	23	16	15	(131 ± 6.1)	(11 ± 2.1)	(31 ± 9.0)	(18 ± 4.4)
	12.5	ND			ND			ND			23	18	19				(20 ± 2.6)
	25	158	157	138	15	16	14	ND			9	15	21	(151 ± 11.3)	(15 ± 1.0)		(15 ± 6.0)
	50	130	154	156	18	13	17	39	28	33	28	15	25	(147 ± 14.5)	(16 ± 2.6)	(33 ± 5.5)	(23 ± 6.8)
	100	142	140	148	18	15	10	33	30	27	18	17	17	(143 ± 4.2)	(14 ± 4.0)	(30 ± 3.0)	(17 ± 0.6)
	200	143	106	138	16	8	13	38	25	29	17	14	14	(129 ± 20.1)	(12 ± 4.0)	(31 ± 6.7)	(15 ± 1.7)
	400	108 *	103 *	96 *	13	14	8	28	27	30	9 *	9 *	8 *	(102 ± 6.0)	(12 ± 3.2)	(28 ± 1.5)	(9 ± 0.6)
	800	86 *	94 *	88 *	16 *	10 *	12 *	25 *	18 *	23 *				(89 ± 4.2)	(13 ± 3.1)	(22 ± 3.6)	
	1600							12 *	11 *	13 *						(12 ± 1.0)	
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	682	650	670	232	245	242	954	935	930	1103	1071	999	(667 ± 16.2)	(240 ± 6.8)	(940 ± 12.7)	(1058 ± 53.3)
	Number of colonies / plate	1262	1111	1309	299	270	290	455	457	566	300	295	294	(1227 ± 103.5)	(286 ± 14.8)	(493 ± 63.5)	(296 ± 3.2)

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% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 3-2. Results of reverse mutation test (II) of methyl dodecanoate ** 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					
				WP2uvrA			
S9mix (-)	0			29 28 25 (27 \pm 2.1)			
	313			24 16 25 (22 \pm 4.9)			
	625			31 28 32 (30 \pm 2.1)			
	1250			21 19 26 (22 \pm 3.6)			
	2500			29 20 29 (26 \pm 5.2)			
	5000			20 28 23 (24 \pm 4.0)			
S9mix (+)	0			23 26 16 (22 \pm 5.1)			
	313			24 25 27 (25 \pm 1.5)			
	625			27 19 20 (22 \pm 4.4)			
	1250			24 34 25 (28 \pm 5.5)			
	2500			11 20 19 (17 \pm 4.9)			
	5000			26 20 23 (23 \pm 3.0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (μg /plate)			0.01			
	Number of colonies / plate			108 151 190 (150 \pm 41.0)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose (μg /plate)			10			
	Number of colonies / plate			1510 1537 1546 (1531 \pm 18.7)			

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

** : Purity was 98% and impurity was unknown.