



5-エチリデン-2-ノルボルネン
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	7
結 論	8
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1~3	

【要 約】

5-エチリデン-2-ノルボルネ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、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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、S9 mix 無添加試験においては、すべての検定菌で150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験ではTA1535とTA98では150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、その他の検定菌では500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で抗菌性が認められた。したがって、本試験では最高用量をS9 mix 無添加試験については250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、S9 mix 添加試験についてはTA1535およびTA98は250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、その他の検定菌は500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として、それぞれ公比2で6用量を設定して実施した。ただし、TA1535およびTA1537のS9 mix 無添加試験と、TA100のS9 mix 添加試験では、本試験Iにおいて抗菌性のない用量が4用量に満たなかったため、最高用量をそれぞれ250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ から125 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に、500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ から250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に下げて、本試験Iをやり直すとともに、本試験II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、5-エチリデン-2-ノルボルネンは、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。

【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、5-エチリデン-2-ノルボルネンについて、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°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°C で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。試験に用いた各検定菌液の濁度を Appendix 1 に示した。

〔被験物質〕

5-エチリデン-2-ノルボルネン (略称: ENB、CAS No. 16219-75-3) は、分子量 120.19 の無色透明液体である。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 99.4 wt% [不純物として軽質分: 0.5 % (このうちビニルシクロヘプテンを 0.3 wt% 含み、未知成分は 0.2 wt%)、重質分: 0.1 wt%] であり、
から供与された。被験物質は、使用時まで酸化劣化を防止するため窒素シールを行い、室温で保管した。

ENBは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: DLR7825 および DLF7632、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、同溶媒で所定の濃度に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。

AF2	: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (上野製薬株式会社)	ロット番号 46,	純度99.9%
SA	: アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社)	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 (和光純薬工業株式会社)	ロット番号 DSF2950,	純度90%以上)

AF2 および 2AA は DMSO に溶解したものを -20°C で凍結保存し、用時解凍した。

9AA は DMSO に、SA は超純水に溶解し、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-ヒスタジン	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、極東製薬工業株式会社製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号: HY1604、1996年10月25日製造、および HY2001、1997年2月7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	バクアガー (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、酵素誘導して作製された S9 (キッコーマン株、ロット番号: RAA-355、1996年11月22日製造、および RAA-359、1997年2月21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 であり、いずれも腹腔内投与したもので、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、トップアガー 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、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた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°C で48時間行い、生じ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〕

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もの（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〕

ENB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、S9 mix 無添加試験においては、すべての検定菌で 150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では TA1535 と TA98 では 150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、その他の検定菌では 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上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 無添加試験については 250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、S9 mix 添加試験については TA1535 と TA98 は 250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、その他の検定菌は 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

上記の最高用量に基づいて、それぞれ公比 2 で 6 用量を設定して本試験 I を実施した (Table 2-1)。ただし、TA1535 と TA1537 の S9 mix 無添加試験、および TA100 の S9 mix 添加試験では、抗菌性のない用量が 4 用量に満たなかったため、最高用量をそれぞれ 250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ から 125 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に、500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ から 250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に下げ、本試験 I をやり直した (Table 2-2)。さらに同一用量で本試験 II を実施した (Table 3)。その結果、すべての検定菌において、2 回の本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。

ENBについて実施したすべての試験において、用いた試験の調製液および 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、5-エチリデン-2-ノルボルネンは、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、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

Table 1. Cytotoxicity of 5-ethylidene-2-norbornene 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			
S9 mix (-)	0	95	103	94	7	8	9	25	20	38	25	19	25	7	6	7	
		(97 ± 4.9)			(8 ± 1.0)			(28 ± 9.3)			(23 ± 3.5)			(7 ± 0.6)			
	50.0	93			10			29			15			5			
	150	67 *			6 *			21 *			10 *			8 *			
	500	0 *			0 *			13 *			0 *			0 *			
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			14 *			0 *			0 *			
S9 mix (+)	0	108	99	122	10	9	11	26	24	27	23	28	29	12	6	9	
		(110 ± 11.6)			(10 ± 1.0)			(26 ± 1.5)			(27 ± 3.2)			(9 ± 3.0)			
	50.0	113			8			35			31			11			
	150	102			11 *			23			24 *			11			
	500	48 *			0 *			23 *			23 *			10 *			
	1500	0 *			0 *			15 *			0 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			23 *			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	543	583	559	533	543	568	166	194	244	643	587	654	1907	1616	1554	
		(562 ± 20.1)			(548 ± 18.0)			(201 ± 39.5)			(628 ± 35.9)			(1692 ± 188.5)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	798	631	683	160	228	211	290	255	315	562	440	447	223	186	209	
		(704 ± 85.5)			(200 ± 35.4)			(287 ± 30.1)			(483 ± 68.5)			(206 ± 18.7)			

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.

Purity was 99.4 wt% and 0.3wt% vinylbicycloheptene and 0.3 wt% unidentified compounds were contained as impurities.

Table 2-1. Mutagenicity of 5-ethylidene-2-norbornene 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	93	110	91	19	17	11	20	19	23	25	9	24	5	8	5	
		(98 ± 10.4)			(16 ± 4.2)			(21 ± 2.1)			(19 ± 9.0)			(6 ± 1.7)			
	7.81	84	79	92	14	16	18	26	25	13	14	16	14	5	6	6	
		(85 ± 6.6)			(16 ± 2.0)			(21 ± 7.2)			(15 ± 1.2)			(6 ± 0.6)			
	15.6	89	84	82	10	18	11	19	22	22	18	22	12	6	7	3	
		(85 ± 3.6)			(13 ± 4.4)			(21 ± 1.7)			(17 ± 5.0)			(5 ± 2.1)			
	31.3	101	98	80	15	8	16	21	20	18	12	19	13	6	4	8	
		(93 ± 11.4)			(13 ± 4.4)			(20 ± 1.5)			(15 ± 3.8)			(6 ± 2.0)			
62.5	69	73	75	8 *	10 *	10 *	23	21	17	15	14	10	5 *	4 *	0 *		
	(72 ± 3.1)			(9 ± 1.2)			(20 ± 3.1)			(13 ± 2.6)			(3 ± 2.6)				
125	36 *	83 *	77 *	0 *	0 *	0 *	14 *	11 *	20 *	7 *	14 *	13 *	2 *	1 *	7 *		
	(65 ± 25.6)			(0 ± 0.0)			(15 ± 4.6)			(11 ± 3.8)			(3 ± 3.2)				
250	56 *	0 *	9 *	0 *	0 *	0 *	26 *	17 *	18 *	0 *	0 *	0 *	2 *	0 *	1 *		
	(22 ± 30.1)			(0 ± 0.0)			(20 ± 4.9)			(0 ± 0.0)			(1 ± 1.0)				
S9 mix (+)	0	115	116	127	22	11	17	31	32	40	32	32	39	11	8	12	
		(119 ± 6.7)			(17 ± 5.5)			(34 ± 4.9)			(34 ± 4.0)			(10 ± 2.1)			
	7.81			ND	21	10	13			ND	28	32	22			ND	
					(15 ± 5.7)						(27 ± 5.0)						
	15.6	107	73	83	20	14	17	25	28	19	31	26	26	7	10	7	
		(88 ± 17.5)			(17 ± 3.0)			(24 ± 4.6)			(28 ± 2.9)			(8 ± 1.7)			
	31.3	91	71	95	9	10	16	23	29	30	24	40	30	6	8	9	
		(86 ± 12.9)			(12 ± 3.8)			(27 ± 3.8)			(31 ± 8.1)			(8 ± 1.5)			
62.5	78	99	85	9	15	12	33	21	21	38	30	28	13	8	9		
	(87 ± 10.7)			(12 ± 3.0)			(25 ± 6.9)			(32 ± 5.3)			(10 ± 2.6)				
125	34 *	72	86	11 *	4 *	8 *	30	22	23	37	27	21	5	5	8		
	(64 ± 26.9)			(8 ± 3.5)			(25 ± 4.4)			(28 ± 8.1)			(6 ± 1.7)				
250	42 *	25 *	47 *	6 *	10 *	6 *	27	24	26	23 *	18 *	20 *	2 *	8 *	5 *		
	(38 ± 11.5)			(7 ± 2.3)			(26 ± 1.5)			(20 ± 2.5)			(5 ± 3.0)				
500	22 *	22 *	14 *			ND	28 *	37 *	22 *			ND	5 *	0 *	5 *		
	(19 ± 4.6)						(29 ± 7.5)						(3 ± 2.9)				
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	456	465	416	192	200	162	127	128	150	639	636	634	716	652	597	
		(446 ± 26.1)			(185 ± 20.0)			(135 ± 13.0)			(636 ± 2.5)			(655 ± 59.6)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	405	421	422	182	201	210	442	484	533	434	389	405	185	167	153	
		(416 ± 9.5)			(198 ± 14.3)			(486 ± 45.5)			(409 ± 22.8)			(168 ± 16.0)			

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 99.4 wt% and 0.3wt% vinylbicycloheptene and 0.3 wt% unidentified compounds were contained as impurities.

ND : Not done

Table 2-2. Mutagenicity of 5-ethylidene-2-norbornene 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		TA1537		
S9 mix (-)	0		10 11 16 (12 ± 3.2)			11 5 9 (8 ± 3.1)	
	3.91		14 8 9 (10 ± 3.2)			2 7 4 (4 ± 2.5)	
	7.81		14 7 8 (10 ± 3.8)			6 7 7 (7 ± 0.6)	
	15.6		9 14 18 (14 ± 4.5)			3 1 6 (3 ± 2.5)	
	31.3		10 11 14 (12 ± 2.1)			4 7 7 (6 ± 1.7)	
	62.5		9 * 7 * 13 * (10 ± 3.1)			5 * 4 * 3 * (4 ± 1.0)	
	125		1 * 6 * 4 * (4 ± 2.5)			3 * 1 * 2 * (2 ± 1.0)	
S9 mix (+)	0	72 88 84 (81 ± 8.3)					
	7.81	64 81 69 (71 ± 8.7)					
	15.6	75 68 63 (69 ± 6.0)					
	31.3	72 85 69 (75 ± 8.5)					
	62.5	64 91 83 (79 ± 13.9)					
	125	61 * 62 * 39 * (54 ± 13.0)					
	250	33 * 44 * 38 * (38 ± 5.5)					
Positive control S9 mix (-)	Chemical		SA			9AA	
	Dose (µg /plate)		0.5			80	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA					
	Dose (µg /plate)	1					
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	290 279 280 (283 ± 6.1)					

SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.4 wt% and 0.3wt% vinylbicycloheptene and 0.3 wt% unidentified compounds were contained as impurities.

Table 3. Mutagenicity of 5-ethylidene-2-norbornene 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	92	83	72	16	14	11	22	20	15	24	17	15	8	8	5	(82 ± 10.0)	(14 ± 2.5)	(19 ± 3.6)	(19 ± 4.7)	(7 ± 1.7)
	3.91	ND			14	10	15	ND			ND			2	5	11	(13 ± 2.6)			(6 ± 4.6)	
	7.81	82	89	109	16	13	8	23	21	17	25	23	19	6	5	9	(93 ± 14.0)	(12 ± 4.0)	(20 ± 3.1)	(22 ± 3.1)	(7 ± 2.1)
	15.6	92	85	91	18	9	13	13	17	19	28	13	16	7	4	3	(89 ± 3.8)	(13 ± 4.5)	(16 ± 3.1)	(19 ± 7.9)	(5 ± 2.1)
	31.3	82	72	75	8	14	11	31	16	21	11	27	21	5	3	8	(76 ± 5.1)	(11 ± 3.0)	(23 ± 7.6)	(20 ± 8.1)	(5 ± 2.5)
	62.5	70	72	86	6 *	5 *	1 *	14	15	20	15	20	25	0 *	3 *	4 *	(76 ± 8.7)	(4 ± 2.6)	(16 ± 3.2)	(20 ± 5.0)	(2 ± 2.1)
	125	41 *	38 *	56 *	0 *	0 *	0 *	21 *	21 *	31 *	2 *	2 *	1 *	0 *	3 *	0 *	(45 ± 9.6)	(0 ± 0.0)	(24 ± 5.8)	(2 ± 0.6)	(1 ± 1.7)
	250	0 *	0 *	0 *	ND			12 *	9 *	13 *	0 *	2 *	3 *	ND			(0 ± 0.0)		(11 ± 2.1)	(2 ± 1.5)	
S9 mix (+)	0	98	82	88	17	15	13	31	21	25	39	38	28	11	10	22	(89 ± 8.1)	(15 ± 2.0)	(26 ± 5.0)	(35 ± 6.1)	(14 ± 6.7)
	7.81	74	100	101	5	15	11	ND			33	29	28	ND			(92 ± 15.3)	(10 ± 5.0)		(30 ± 2.6)	
	15.6	88	96	92	5	6	9	28	20	25	24	30	19	4	7	10	(92 ± 4.0)	(7 ± 2.1)	(24 ± 4.0)	(24 ± 5.5)	(7 ± 3.0)
	31.3	79	120	87	11	17	14	21	27	25	25	34	30	11	11	4	(95 ± 21.7)	(14 ± 3.0)	(24 ± 3.1)	(30 ± 4.5)	(9 ± 4.0)
	62.5	100	91	82	14	14	16	19	27	15	30	26	29	10	5	10	(91 ± 9.0)	(15 ± 1.2)	(20 ± 6.1)	(28 ± 2.1)	(8 ± 2.9)
	125	48 *	67 *	82 *	9 *	13 *	5 *	23	17	24	21	30	26	12	11	14	(66 ± 17.0)	(9 ± 4.0)	(21 ± 3.8)	(26 ± 4.5)	(12 ± 1.5)
	250	35 *	38 *	59 *	9 *	8 *	11 *	29	23	26	33 *	17 *	31 *	6 *	7 *	4 *	(44 ± 13.1)	(9 ± 1.5)	(26 ± 3.0)	(27 ± 8.7)	(6 ± 1.5)
	500	ND			ND			25 *	19 *	25 *	ND			0 *	0 *	1 *			(23 ± 3.5)		(0 ± 0.6)
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	453	477	416	499	491	505	67	75	72	555	542	494	825	843	749	(449 ± 30.7)	(498 ± 7.0)	(71 ± 4.0)	(530 ± 32.1)	(806 ± 49.9)
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2							
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	517	415	396	259	210	200	293	275	260	330	332	502	209	190	159	(443 ± 65.1)	(223 ± 31.6)	(276 ± 16.5)	(388 ± 98.7)	(186 ± 25.2)

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 99.4 wt% and 0.3wt% vinylbicycloheptene and 0.3 wt% unidentified compounds were contained as impurities.

ND : Not done