



トリプロピレングリコール
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 |
| 材料および試験方法 | 3 |
| 試験結果および考察 | 6 |
| 参 考 文 献 | 8 |
| Tables 1～5 | |

【要 約】

トリプロピレングリコール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。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験では 50～5000 μg /プレート、本試験は 312.5～5000 μg /プレートの用量で試験を実施した。

その結果、2回実施した本試験において、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再現性のある増加が認められなかったことから、トリプロピレングリコールは、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、トリプロピレングリコールについて、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, Lot 番号 B-1674/1 および
B-1674/2) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、 37°C 、10~12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〕

トリプロピレングリコール (CAS No. 24800-44-0、以下TPGと略) は、分子量 192.26
の無色透明の液体である。純度98%以上のもの (ロット番号：

) を から供与された。被験物質は、使用時まで冷暗所にて保
管した。

TPGは、蒸留水に 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、純度換算は行わな
かった。

秦野研究所においてTPGの蒸留水中での安定性試験を高濃度 (50 mg/ml) および低濃
度 (3 mg/ml) の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後4時間
における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値 (0時間) の平均に対して、99.6
および 101%であった。これらの値は、当研究所で規定した許容範囲内にあった
(Appendix 1)。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml溶液の
含量は既定濃度に対し、102~104%、3.125 mg/ml 溶液は、106~107%であった。これら

の値も当研究所の規定した許容範囲内であった (Appendix 2)。

以上の結果から、TPGは水溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

[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°C 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) バクト7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、本試験においては、ロット番号 : DJ040IH, 1992年9月4日製造、再現性試験においては、ロット番号 : DJ050JH, 1992年10月12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 | リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物 | 3.5 g |
| クエン酸・1水和物 | 2 g | グルコース | 20 g |
| リン酸水素二カリウム | 10 g | バクト7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 |
| 塩化カリウム | 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 (キッコマン株、ロット番号 RAA-280、1992年7月24日製造、RAA-284、1992年10月30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。

小試験管中にトッパアガー 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蒸留水、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、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、さらに再現性試験を行い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の平均値が、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】

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。

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。TPGについて、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比約3で試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において抗菌性は認められなかった。

以上の結果から、本試験における最高用量を直接法、代謝活性化法ともにすべての検定菌で 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比2で5用量を設定することとした。

〔本試験〕

TPGについて、直接法、代謝活性化法ともに 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で2回の試験を実施した。結果を Table 2、3 に示した。1回目の試験においては、TA1535の直接法の最高用量の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ および TA1537の代謝活性化法の 312.5 および 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量において、陰性対照群の2倍を超える変異コロニー数が計測された。その他の検定菌については、直接法、代謝活性化法のいずれにおいても変異コロニー数の増加は認められなかった。

2回目の試験においては、TA1535の直接法の 312.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量においてのみ陰性対照値の2倍を超える変異コロニーが計測された。その他の検定菌については、直接法、代謝活性化法のいずれにおいても変異コロニー数の増加は認められなかった。

〔再現性試験〕

2回の本試験で TA1535 の直接法および TA1537 の代謝活性化法で認められた陰性対照値の2倍を超える変異コロニーの出現については、再現性試験を実施した。TA1535の直接法においては、異なった用量で陰性対照群の2倍を超える変異コロニー数が認められたことから、2回の再現性試験を実施した。結果を Table 4、5 に示す。その結果、TA1535の直接法および TA1537の代謝活性化法のいずれの用量においても、陰性対照群の2倍を超える変異コロニーの増加は認められなかった。

以上の結果から、本試験における陰性対照値の2倍を超える変異コロニーの出現には用量依存性が認められず、また再現性も得られなかったことから、陰性対照値の低いことによる偶発的なものであると考えられた。

T P G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、T P G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。

【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 tripropylene glycol

| 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 | 133 | 114 | 126 | 13 | 9 | 13 | 20 | 14 | 14 | 21 | 26 | 14 | 9 | 6 | 7 | |
| | | (124 \pm 9.6) | | | (12 \pm 2.3) | | | (16 \pm 3.5) | | | (20 \pm 6.0) | | | (7 \pm 1.5) | | | |
| | 50 | 110 | | | 13 | | | 7 | | | 21 | | | 13 | | | |
| | 150 | 104 | | | 8 | | | 7 | | | 22 | | | 6 | | | |
| | 500 | 121 | | | 11 | | | 14 | | | 21 | | | 2 | | | |
| | 1500 | 108 | | | 19 | | | 8 | | | 17 | | | 4 | | | |
| | 5000 | 152 | | | 17 | | | 10 | | | 11 | | | 3 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S9Mix (+) | 0 | 123 | 148 | 141 | 20 | 14 | 18 | 13 | 11 | 9 | 35 | 32 | 24 | 11 | 10 | 6 | |
| | | (137 \pm 12.9) | | | (17 \pm 3.1) | | | (11 \pm 2.0) | | | (30 \pm 5.7) | | | (9 \pm 2.6) | | | |
| | 50 | 142 | | | 12 | | | 28 | | | 23 | | | 18 | | | |
| | 150 | 119 | | | 22 | | | 27 | | | 29 | | | 15 | | | |
| | 500 | 147 | | | 13 | | | 17 | | | 30 | | | 11 | | | |
| | 1500 | 129 | | | 15 | | | 26 | | | 44 | | | 12 | | | |
| | 5000 | 136 | | | 15 | | | 20 | | | 18 | | | 18 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | | | |
| Positive control S9 Mix (-) | Number of colonies / plate | 535 | 533 | 501 | 205 | 181 | 196 | 174 | 176 | 190 | 504 | 523 | 487 | 3239 | 3430 | 3577 | |
| | | (523 \pm 19.1) | | | (194 \pm 12.1) | | | (180 \pm 8.7) | | | (505 \pm 18.0) | | | (3415 \pm 169.5) | | | |
| Positive control S9 Mix (+) | Number of colonies / plate | 481 | 424 | 456 | 277 | 228 | 191 | 421 | 425 | 422 | 240 | 202 | 208 | 151 | 174 | 194 | |
| | | (454 \pm 28.6) | | | (232 \pm 43.1) | | | (423 \pm 2.1) | | | (217 \pm 20.4) | | | (173 \pm 21.5) | | | |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with tripropylene glycol

| 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 | 151 | 169 | 164 | 12 | 11 | 8 | 25 | 14 | 18 | 26 | 19 | 27 | 11 | 11 | 10 | |
| | | (161 \pm 9.3) | | | (10 \pm 2.1) | | | (19 \pm 5.6) | | | (24 \pm 4.4) | | | (11 \pm 0.6) | | | |
| | 312.5 | 149 | 164 | 149 | 22 | 16 | 16 | 25 | 22 | 17 | 26 | 16 | 13 | 14 | 9 | 7 | |
| | | (154 \pm 8.7) | | | (18 \pm 3.5) | | | (21 \pm 4.0) | | | (18 \pm 6.8) | | | (10 \pm 3.6) | | | |
| | 625 | 159 | 139 | 140 | 17 | 15 | 12 | 17 | 28 | 26 | 14 | 31 | 25 | 6 | 11 | 8 | |
| | | (146 \pm 11.3) | | | (15 \pm 2.5) | | | (24 \pm 5.9) | | | (23 \pm 8.6) | | | (8 \pm 2.5) | | | |
| | 1250 | 171 | 151 | 160 | 13 | 26 | 8 | 23 | 18 | 21 | 26 | 21 | 25 | 15 | 10 | 8 | |
| | | (161 \pm 10.0) | | | (16 \pm 9.3) | | | (21 \pm 2.5) | | | (24 \pm 2.6) | | | (11 \pm 3.6) | | | |
| 2500 | 161 | 147 | 146 | 11 | 12 | 11 | 19 | 22 | 20 | 24 | 29 | 23 | 10 | 8 | 8 | | |
| | (151 \pm 8.4) | | | (11 \pm 0.6) | | | (20 \pm 1.5) | | | (25 \pm 3.2) | | | (9 \pm 1.2) | | | | |
| 5000 | 123 | 142 | 154 | 21 | 20 | 19 | 20 | 19 | 22 | 26 | 25 | 25 | 9 | 9 | 11 | | |
| | (140 \pm 15.6) | | | (20 \pm 1.0) | | | (20 \pm 1.5) | | | (25 \pm 0.6) | | | (10 \pm 1.2) | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S9 Mix (+) | 0 | 157 | 156 | 153 | 20 | 19 | 18 | 20 | 20 | 20 | 27 | 26 | 27 | 8 | 7 | 6 | |
| | | (155 \pm 2.1) | | | (19 \pm 1.0) | | | (20 \pm 0.0) | | | (27 \pm 0.6) | | | (7 \pm 1.0) | | | |
| | 312.5 | 133 | 142 | 131 | 20 | 16 | 11 | 22 | 34 | 20 | 46 | 30 | 35 | 19 | 11 | 17 | |
| | | (135 \pm 5.9) | | | (16 \pm 4.5) | | | (25 \pm 7.6) | | | (37 \pm 8.2) | | | (16 \pm 4.2) | | | |
| | 625 | 174 | 150 | 173 | 14 | 13 | 20 | 26 | 28 | 21 | 44 | 27 | 43 | 9 | 11 | 9 | |
| | | (166 \pm 13.6) | | | (16 \pm 3.8) | | | (25 \pm 3.6) | | | (38 \pm 9.5) | | | (10 \pm 1.2) | | | |
| | 1250 | 156 | 169 | 159 | 18 | 19 | 11 | 18 | 15 | 17 | 31 | 31 | 34 | 8 | 15 | 12 | |
| | | (161 \pm 6.8) | | | (16 \pm 4.4) | | | (17 \pm 1.5) | | | (32 \pm 1.7) | | | (12 \pm 3.5) | | | |
| 2500 | 145 | 164 | 159 | 16 | 12 | 18 | 21 | 23 | 32 | 33 | 40 | 38 | 14 | 17 | 13 | | |
| | (156 \pm 9.8) | | | (15 \pm 3.1) | | | (25 \pm 5.9) | | | (37 \pm 3.6) | | | (15 \pm 2.1) | | | | |
| 5000 | 144 | 145 | 155 | 15 | 9 | 15 | 19 | 24 | 24 | 29 | 40 | 47 | 10 | 12 | 12 | | |
| | (148 \pm 6.1) | | | (13 \pm 3.5) | | | (22 \pm 2.9) | | | (39 \pm 9.1) | | | (11 \pm 1.2) | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | 646 | 612 | 613 | 152 | 185 | 154 | 232 | 251 | 211 | 620 | 647 | 672 | 2837 | 2633 | 2595 | |
| | | (624 \pm 19.3) | | | (164 \pm 18.5) | | | (231 \pm 20.0) | | | (646 \pm 26.0) | | | (2688 \pm 130.1) | | | |
| | Number of colonies / plate | 615 | 667 | 602 | 154 | 151 | 165 | 749 | 773 | 721 | 195 | 181 | 143 | 146 | 179 | 190 | |
| | | (628 \pm 34.4) | | | (157 \pm 7.4) | | | (748 \pm 26.0) | | | (173 \pm 26.9) | | | (172 \pm 22.9) | | | |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with tripropylene glycol

| 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 | 139 | 134 | 158 | 11 | 12 | 8 | 16 | 19 | 16 | 28 | 30 | 27 | 9 | 9 | 11 | |
| | | (144 \pm 12.7) | | | (10 \pm 2.1) | | | (17 \pm 1.7) | | | (28 \pm 1.5) | | | (10 \pm 1.2) | | | |
| | 312.5 | 133 | 154 | 143 | 19 | 23 | 18 | 19 | 16 | 25 | 24 | 33 | 31 | 5 | 13 | 13 | |
| | | (143 \pm 10.5) | | | (20 \pm 2.6) | | | (20 \pm 4.6) | | | (29 \pm 4.7) | | | (10 \pm 4.6) | | | |
| | 625 | 131 | 114 | 145 | 22 | 15 | 20 | 17 | 23 | 21 | 25 | 28 | 22 | 14 | 16 | 11 | |
| | | (130 \pm 15.5) | | | (19 \pm 3.6) | | | (20 \pm 3.1) | | | (25 \pm 3.0) | | | (14 \pm 2.5) | | | |
| | 1250 | 144 | 135 | 150 | 24 | 16 | 17 | 27 | 22 | 17 | 31 | 26 | 29 | 24 | 12 | 7 | |
| | (143 \pm 7.5) | | | (19 \pm 4.4) | | | (22 \pm 5.0) | | | (29 \pm 2.5) | | | (14 \pm 8.7) | | | | |
| 2500 | 122 | 136 | 137 | 13 | 23 | 21 | 21 | 16 | 19 | 30 | 37 | 28 | 12 | 13 | 11 | | |
| | (132 \pm 8.4) | | | (19 \pm 5.3) | | | (19 \pm 2.5) | | | (32 \pm 4.7) | | | (12 \pm 1.0) | | | | |
| 5000 | 127 | 146 | 134 | 17 | 11 | 20 | 32 | 22 | 25 | 29 | 24 | 27 | 4 | 7 | 7 | | |
| | (136 \pm 9.6) | | | (16 \pm 4.6) | | | (26 \pm 5.1) | | | (27 \pm 2.5) | | | (6 \pm 1.7) | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S9Mix (+) | 0 | 125 | 149 | 152 | 21 | 16 | 10 | 19 | 28 | 19 | 38 | 51 | 34 | 18 | 9 | 15 | |
| | | (142 \pm 14.8) | | | (16 \pm 5.5) | | | (22 \pm 5.2) | | | (41 \pm 8.9) | | | (14 \pm 4.6) | | | |
| | 312.5 | 183 | 192 | 134 | 19 | 12 | 21 | 27 | 27 | 26 | 37 | 52 | 39 | 13 | 11 | 13 | |
| | | (170 \pm 31.2) | | | (17 \pm 4.7) | | | (27 \pm 0.6) | | | (43 \pm 8.1) | | | (12 \pm 1.2) | | | |
| | 625 | 139 | 150 | 146 | 23 | 28 | 22 | 19 | 16 | 19 | 40 | 53 | 50 | 13 | 15 | 11 | |
| | | (145 \pm 5.6) | | | (24 \pm 3.2) | | | (18 \pm 1.7) | | | (48 \pm 6.8) | | | (13 \pm 2.0) | | | |
| | 1250 | 152 | 165 | 133 | 16 | 12 | 18 | 27 | 21 | 22 | 47 | 39 | 42 | 12 | 11 | 8 | |
| | (150 \pm 16.1) | | | (15 \pm 3.1) | | | (23 \pm 3.2) | | | (43 \pm 4.0) | | | (10 \pm 2.1) | | | | |
| 2500 | 151 | 165 | 137 | 18 | 19 | 17 | 21 | 17 | 19 | 36 | 48 | 41 | 11 | 12 | 14 | | |
| | (151 \pm 14.0) | | | (18 \pm 1.0) | | | (19 \pm 2.0) | | | (42 \pm 6.0) | | | (12 \pm 1.5) | | | | |
| 5000 | 155 | 164 | 156 | 9 | 16 | 20 | 17 | 21 | 22 | 44 | 52 | 39 | 18 | 21 | 14 | | |
| | (158 \pm 4.9) | | | (15 \pm 5.6) | | | (20 \pm 2.6) | | | (45 \pm 6.6) | | | (18 \pm 3.5) | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | 586 | 617 | 614 | 308 | 293 | 274 | 192 | 185 | 179 | 639 | 612 | 604 | 2840 | 2998 | 3240 | |
| | | (606 \pm 17.1) | | | (292 \pm 17.0) | | | (185 \pm 6.5) | | | (618 \pm 18.3) | | | (3026 \pm 201.5) | | | |
| Positive control | Chemical | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | |
| | Dose (μg /plate) | 1 | | | 2 | | | 10 | | | 0.5 | | | 2 | | | |
| S9 Mix (+) | Number of colonies / plate | 889 | 769 | 794 | 283 | 239 | 280 | 676 | 518 | 615 | 321 | 361 | 366 | 209 | 188 | 199 | |
| | | (817 \pm 63.3) | | | (267 \pm 24.6) | | | (603 \pm 79.7) | | | (349 \pm 24.7) | | | (199 \pm 10.5) | | | |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

Table 4. Results of bacterial reverse mutation assay (confirmation test I) with tripropylene glycol

| 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 | |
| S9 Mix (-) | 0 | | 17 19 16 (17 \pm 1.5) | | | | |
| | 312.5 | | 17 20 13 (17 \pm 3.5) | | | | |
| | 625 | | 17 9 12 (13 \pm 4.0) | | | | |
| | 1250 | | 14 10 14 (13 \pm 2.3) | | | | |
| | 2500 | | 15 14 15 (15 \pm 0.6) | | | | |
| | 5000 | | 14 11 16 (14 \pm 2.5) | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| S9 Mix (+) | 0 | | | | | 10 13 8 (10 \pm 2.5) | |
| | 312.5 | | | | | 9 16 7 (11 \pm 4.7) | |
| | 625 | | | | | 9 14 12 (12 \pm 2.5) | |
| | 1250 | | | | | 13 14 16 (14 \pm 1.5) | |
| | 2500 | | | | | 19 13 14 (15 \pm 3.2) | |
| | 5000 | | | | | 13 11 20 (15 \pm 4.7) | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 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 | | 161 178 163 (167 \pm 9.3) | | | | |
| Positive control S9 Mix (+) | Chemical | 2AA | 2AA | 2AA | 2AA | 2AA | |
| | Dose (μg /plate) | 1 | 2 | 10 | 0.5 | 2 | |
| | Number of colonies / plate | | | | | 316 306 283 (302 \pm 16.9) | |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

Table 5. Results of bacterial reverse mutation assay (confirmation test II) with tripropylene glycol

| 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 | | 20 11 9 (13 \pm 5.9) | | | | |
| | 312.5 | | 15 14 20 (16 \pm 3.2) | | | | |
| | 625 | | 13 17 13 (14 \pm 2.3) | | | | |
| | 1250 | | 12 9 9 (10 \pm 1.7) | | | | |
| | 2500 | | 10 15 17 (14 \pm 3.6) | | | | |
| | 5000 | | 15 9 12 (12 \pm 3.0) | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| S9Mix (+) | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 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 | | 155 141 166 (154 \pm 12.5) | | | | |
| Positive control S9 Mix (+) | Chemical | 2AA | 2AA | 2AA | 2AA | 2AA | |
| | Dose (μg /plate) | 1 | 2 | 10 | 0.5 | 2 | |
| | Number of colonies / plate | | | | | | |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene