

最終報告書

表 題：4-メチル-1-ペンテンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR02191

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

表紙	1
目次	4
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	17
考察	18

Tables

Table 1	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-finding test).....	20
Table 2	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-finding test).....	21
Table 3	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (I)	22
Table 4	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (I)	23
Table 5	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (II)	24
Table 6	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (II)	25

Figures

Figure 1-1	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 without metabolic activation (dose-response curves).....	26
Figure 1-2	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 with metabolic activation (dose-response curves).....	27
Figure 2-1	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 without metabolic activation (dose-response curves).....	28
Figure 2-2	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 with metabolic activation (dose-response curves).....	29
Figure 3-1	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-response curves).....	30
Figure 3-2	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-response curves).....	31
Figure 4-1	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 without metabolic activation (dose-response curves).....	32
Figure 4-2	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 with metabolic activation (dose-response curves).....	33
Figure 5-1	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 without metabolic activation (dose-response curves).....	34
Figure 5-2	Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 with metabolic activation (dose-response curves).....	35

要 約

4-メチル-1-ペンテンの細菌における遺伝子突然変異誘発性を検討する目的で、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験を実施した。試験は直接法(代謝活性化系 S9 の非存在下)ならびに代謝活性化法(代謝活性化系 S9 の存在下)において、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質には揮発性があることから、各菌株とも用量毎にパウチ袋に入れ密封し静置培養を行った。

用量設定試験では、被験物質の最高用量を調製溶媒であるジメチルスルホキシドへの溶解性に基づき 3000 µg/plate とし、以下公比 3 で低下させた計 7 用量(4.12~3000 µg/plate)を設定した。本試験では、用量設定試験の結果に基づき被験物質の最高用量を 3000 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 7 用量(46.9~3000 µg/plate)を設定した。

本試験を 2 回実施した結果、直接法および代謝活性化法のいずれの系列においても、各菌株の被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、また用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられず、結果は陰性であった。被験物質の析出が検討した全ての用量で、また生育阻害が各菌株の 750 µg/plate 以上の用量あるいは 1500 µg/plate 以上の用量で観察された。

陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。陽性対照群の値はそれぞれ陰性対照群の値の 2 倍以上の明確な増加が認められた。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、4-メチル-1-ペンテンは、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

緒 言

4-メチル-1-ペンテンの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、直接法(代謝活性化系 S9 の非存在下)ならびに代謝活性化法(代謝活性化系 S9 の存在下)において、プレインキュベーション法により実施した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質は 4-メチル-1-ペンテンであり、CAS 番号は 691-37-2、化学式は C_6H_{12} である。当該試験では、より提供された純度 98.36% のロット番号 を使用した。

4-メチル-1-ペンテンは沸点が 54℃、蒸気圧が 35.6 kPa (267 mmHg)/25℃、融点が -154℃、比重が 0.664 (20/4℃)、蒸気密度が 2.9 (空気=1)、引火点が -25℃、発火点が 300℃で、溶解性は水にほとんど不溶等の物理化学的性状を示す無色透明の液体である (Appendix 1-1 および 1-2)。

4-メチル-1-ペンテンは強酸化剤と接触すると激しい反応が起こりうる引火性の物質であることから、受入後は直射日光を避け、火気、熱源より遠ざけ、室温(実測範囲 20～25℃)、気密条件下で保存した。被験物質は、眼、皮膚および衣服にふれないよう、適切な保護具を着用して取扱った。

2. 被験物質の調製

被験物質を精秤し、ジメチルスルホキシド(ロット番号 PW186、株式会社同仁化学研究所)を用いて 30 mg/mL 調製液を調製した。

用量設定試験では、30 mg/mL 調製液から公比 3 で段階希釈した調製液、すなわち 10、3.33、1.11、0.370、0.123 および 0.0412 mg/mL を調製した。

本試験では、30 mg/mL 調製液から公比 2 で段階希釈した調製液、すなわち 15、7.5、3.75、1.88、0.938 および 0.469 mg/mL を調製した。

調製液の安定性では、予備試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体の反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質溶液は用時に調製し、用量設定試験では調製後 1.3 時間以内に、本試験では調製後 2.5 時間以内に使用した。

3. 陰性対照物質およびその調製

陰性対照物質として、被験物質の媒体のジメチルスルホキシド(ロット番号 PW186、株式会社同仁化学研究所)を使用した。ジメチルスルホキシドは、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。

4. 陽性対照物質およびその調製

陽性対照物質として、以降の既知変異原物質を使用した。これらの陽性対照物質は、遮光および冷所(2~8℃)で保存した。

陽性対照物質は、含量補正をせずにそれぞれ次表の濃度に調製し分注後-20℃以下で凍結保存したものを、解凍後 1.9 時間以内に使用した。調製液は、調製日より 4 カ月以内(使用期限：調製後 1 年)に使用した。

陽性対照物質	調製濃度	調製媒体
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(含量 100.2%) ロット番号 WAP0369 和光純薬工業株式会社	0.1 および 1 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 NJ151 株式会社同仁化学研究所
アジ化ナトリウム (純度 99.2%) ロット番号 ELE2328 和光純薬工業株式会社	5 µg/mL	日本薬局方注射用水 ロット番号 3I77 株式会社大塚製薬工場
9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物 (含量 98.8%) ロット番号 03024JR Aldrich Chemical Company, Inc.	800 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 NJ151 株式会社同仁化学研究所
2-アミノアントラセン (含量 97.4%) ロット番号 TCG4316 和光純薬工業株式会社	5、10、20 およ び 100 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 NJ151 株式会社同仁化学研究所

5. 試験菌株

試験には、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 ならびに *Escherichia coli* WP2uvrA を使用した。これらの菌株は、1991 年 10 月 18 日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)より分与された。また、これらの菌株は遺伝毒性を有する化学物質の検索に適した細菌として広く受け入れられていることから選択した。

各菌株は、培養液 8 mL に対しジメチルスルホキシド(ロット番号 LM020、株式会社同仁化学研究所) 0.7 mL を加え、試験チューブに分注後-80℃以下で凍結保存した。培養液の一部についてアミノ酸要求性、膜変異 rfa 特性、紫外線感受性、薬剤耐性ならびに陰性対照物質および陽性対照物質での復帰変異コロニー数を検査し、これらの特性が正常に保持されていることを確認した上で試験に使用した。

6. 培地

(1) 前培養用培地

前培養用のニュートリエントブロス培地として、ニュートリエントブロス(OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号 298714、OXOID LTD.)を日本薬局方注射用水(ロット番号 3I71 および 4C78、株式会社大塚製薬工場)を用いて 25 g/L に調製した。*S. typhimurium* TA98 および TA100 の培地には、使用時にアンピシリン(ロット番号 M3F9025、ナカライテスク株式会社)を 25 µg/mL となるように添加した。

(2) 試験用培地(最少グルコース寒天培地)

使用した最少グルコース寒天培地(バイタルメディア AMT-0 培地、ロット番号 DZL54901、2004 年 4 月 9 日製造、極東製薬工業株式会社)の 1000 mL 中の組成は次表の通りである。

培地 1000 mL 中の組成	
硫酸マグネシウム・7 水塩	0.2 g
クエン酸・1 水塩	2.0 g
リン酸二カリウム・無水塩	10.0 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20.0 g
寒天末(OXOID AGAR No. 1、ロット番号 831568-02)	15.0 g

(3) 重層用培地

次表の組成のソフトアガーおよびアミノ酸溶液を調製し、使用時に(A) : (B) = 10 : 1の容量比で混合した。*S. typhimurium*にはL-ヒスチジンおよびD-ビオチンのアミノ酸溶液を、*E. coli*にはL-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。これらの重層用培地は、使用時まで約45℃に保温した。

組 成	
(A) ソフトアガー	
Bacto™ Agar	0.6 %
(ロット番号 3168873、Becton, Dickinson and Company)	
塩化ナトリウム	0.5 %
(ロット番号 505F1706、関東化学株式会社)	
(B) アミノ酸溶液	
L-ヒスチジンおよびD-ビオチン溶液	各々 0.5 mmol/L
(L-ヒスチジン、ロット番号 DWN1024、和光純薬工業株式会社)	
(D-ビオチン、ロット番号 TCQ2332、和光純薬工業株式会社)	
または	
L-トリプトファン溶液	0.5 mmol/L
(L-トリプトファン、ロット番号 ASG2385、和光純薬工業株式会社)	

7. S9 mix

S9 mix は、S9(ロット番号 RAA-504、2004年6月11日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor(Cofactor-I、ロット番号 999401、オリエンタル酵母工業株式会社)および日本薬局方注射用水(ロット番号 4B78、株式会社大塚製薬工場)を用いて用時調製した。

S9 は、購入後-80℃以下で保存し、製造日より4カ月以内(使用期限：製造後6カ月)に使用した。このS9は、フェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導したSlc:SD系ラットの肝ホモジネートより調製された。

S9 mix の組成は次表の通りである。

S9 mix 1 mL 中の組成	
S9	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)	4 μmol
還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド(NADH)	4 μmol
リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4	100 μmol

8. 試験群

(1) 用量設定試験

各菌株につき、直接法(代謝活性化系 S9 の非存在下)および代謝活性化法(代謝活性化系 S9 の存在下)で試験を実施した。

被験物質は水に不溶で、ジメチルスルホキシドへ溶解可能な最高濃度が 30 mg/mL であったことから、最高用量は直接法および代謝活性化法ともに 3000 µg/plate とし、以下公比 3 で低下させた計 7 用量(3000、1000、333、111、37.0、12.3 および 4.12 µg/plate)の試験群を設定した。

更に、陰性対照群(ジメチルスルホキシド)および次表の陽性対照群を設定した。

供試菌株	陽性対照物質 (用量 : µg/plate)	
	直接法	代謝活性化法
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	NaN ₃ (0.5)	2-AA (2)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (0.5)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)
<i>E. coli</i> WP2uvrA	AF-2 (0.01)	2-AA (10)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、
 NaN₃ : アジ化ナトリウム、 9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物
 2-AA : 2-アミノアントラセン

(2) 本試験

各菌株につき、直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

用量設定試験の結果、直接法および代謝活性化法とも各菌株の 1000 あるいは 3000 µg/plate の用量で生育障害が認められたことから、本試験用量として、各菌株の直接法および代謝活性化法ともに最高用量を 3000 µg/plate とし、以下公比 2 で用量を低下させた 3000、1500、750、375、188、93.8 および 46.9 µg/plate の計 7 用量の試験群を設定した。

更に、用量設定試験と同様の陰性対照群および陽性対照群を設定した。

(3) プレート数およびプレートの識別

プレート数は、用量設定試験では用量毎に 1 枚、本試験では用量毎に 3 枚とした。

プレートには、試験番号および試験群を特定できるようにラベルを貼付した。

9. 試験方法

(1) 菌株の前培養

容量約 40 mL の L 字管に前培養用培地(ニュートリエントブロス培地) 12 mL を入れ、解凍した保存菌を 12 μ L 接種し、L 字管を氷冷後、37℃、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で 10 時間の往復振盪培養を行った。培養終了時に、菌培養液の OD_{660nm} を比色計(mini photo 518、タイテック株式会社)で測定し、各菌株の生菌数-OD_{660nm} 相関式より生菌数を算出した。生菌数が 1×10^9 cells/mL より多く、十分に菌が生育していることが確認された培養液を試験に使用した。

各培養液の生菌数(計算値)は次表の通りであった。

供試菌株	生菌数(計算値)($\times 10^9$ cells/mL)		
	用量設定試験	本試験(1 回目)	本試験(2 回目)
<i>S. typhimurium</i> TA100	2.53	2.82	2.82
<i>S. typhimurium</i> TA1535	1.44	1.68	1.60
<i>S. typhimurium</i> TA98	1.53	1.76	1.68
<i>S. typhimurium</i> TA1537	1.14	1.30	1.25
<i>E. coli</i> WP2uvrA	3.88	4.28	4.28

(2) 被験物質および対照物質調製液の処理

被験物質および対照物質調製液の処理を、プレインキュベーション法で行った。

被験物質調製液あるいは対照物質調製液 0.1 mL を、直接法の場合は 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH7.4) 0.5 mL と、代謝活性化法の場合は S9 mix 0.5 mL と混合した。その混合液に菌培養液 0.1 mL を加え、37℃、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で 20 分間振盪培養(プレインキュベーション)した。プレインキュベーション終了後、*S. typhimurium* には 0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび 0.05 mmol/L D-ビオチンを含む重層用培地を、*E. coli* には 0.05 mmol/L L-トリプトファンを含む重層用培地を 2 mL 加えて混和し、最少グルコース寒天培地に重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、各菌株の用量毎にプレートをパウチ袋(三菱ガス化学株式会社)に入れ密封し、37℃に設定したインキュベーター(MIR-262：三洋電機株式会社)で 48 時間の静置培養を行った。

試験の都度、被験物質調製液の最高濃度および S9 mix について雑菌の混入の有無を確認した。

(3) プレートの観察

各プレートについて、被験物質の析出の有無を目視確認し、生育阻害の有無を実体顕微鏡(SZ6045TR、オリンパス光学工業株式会社)で確認した後、復帰変異コロニー数を計数した。陽性対照群については、コロニーカウンター(BMS-400、東洋測器株式会社)を用いて計数を行った。陰性対照群および被験物質処理群では、*S. typhimurium* TA100 および *E. coli* WP2uvrA はコロニーカウンターを用いて計数を行った。復帰変異コロニーの大きさが小型である *S. typhimurium* TA98、TA1535、および TA1537 は計数漏れを避けるためデジタル方式コロニーカウンター(DC-3、有限会社フジメディカル)を用いて目視計数した。

菌株の生育阻害の有無の判定は標準操作手順書に基づき以下の基準で行い、1 以上を生育阻害有りとした。

0：生育阻害が認められない。

微細なバックグラウンドコロニー(50 倍程度の倍率で観察可能)が培地一面に観察され、対照群のバックグラウンドコロニーとの差が認められない。

1：わずかな生育阻害が認められる。

対照群に比べ、バックグラウンドコロニーが減少して個々のコロニーの大きさが大きくなっている。

2：中程度の生育阻害が認められる。

隆起した大きな復帰変異コロニーと、平坦で小さなバックグラウンドコロニーが並存している。

3：強い生育阻害が認められる。

バックグラウンドコロニーが復帰変異コロニーと同程度の大きさまで成長し、両者の判別が困難である。

4：生存菌が全く認められない。

(4) 観察結果の集計方法

試験群の復帰変異コロニー数の平均値±標準偏差をもとめた。

10. 試験結果の評価

(1) 試験系の感度確認

陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が、それぞれ試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であり、かつ、陽性対照群の値が陰性対照群の値の2倍以上である場合に、試験系が適切な感度を有しているものと判断した。

(2) 試験結果の判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の2倍以上となり、かつ用量の増加にともなうコロニー数の増加が認められ、その結果に再現性が認められる場合を陽性とした。

成 績

用量設定試験の結果を Table 1 および 2 に、本試験の結果を Table 3～6 に示す。また、本試験における被験物質と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を Figure 1-1～5-2 に示す。

用量設定試験 (4.12～3000 µg/plate) の結果、各菌株の被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の 2 倍未満であり、用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられなかった。被験物質の析出 (寒天プレート表面に油膜状) が全ての用量で観察された。また、生育阻害が、直接法および代謝活性化法ともに各菌株の 1000 µg/plate 以上の用量あるいは 3000 µg/plate の用量で観察された。

本試験 (46.9～3000 µg/plate) を 2 回実施した結果、各菌株の被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の 2 倍未満であり、用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられなかった。被験物質の析出 (寒天プレート表面に油膜状) が全ての用量で観察された。また、生育阻害が、直接法および代謝活性化法ともに各菌株の 750 µg/plate 以上の用量あるいは 1500 µg/plate 以上の用量で観察された。

陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データから求めた管理値 (Appendix 2) の範囲内であった。また、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は全て陰性対照群の値の 2 倍以上であった。

各試験の無菌試験では、被験物質調製液の最高濃度および S9 mix に雑菌の混入はみられなかった。

考 察

4-メチル-1-ペンテンの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。

被験物質は水に不溶で、ジメチルスルホキシドへ溶解可能な最高濃度が 30 mg/mL であったことから、用量設定試験は最高用量を 3000 µg/plate とし実施した。また、被験物質に揮発性があることから、各菌株とも用量毎にパウチ袋に入れ密封し静置培養を行った。その結果、各菌株の高用量で生育阻害が観察されたことから、被験物質は遺伝子突然変異誘発性の評価において十分な濃度が暴露されたと考えられた。本試験は用量設定試験の結果に基づき最高用量を 3000 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 7 用量で実施した。

本試験の結果、各菌株の直接法および代謝活性化法のいずれの系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられず、結果は陰性であった。また、被験物質の析出が検討した全ての用量で観察され、生育阻害が各菌株ともに高用量で観察された。これらの結果は、2 回の試験において再現性が確認された。

陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値には、それぞれの陰性対照群の値と比較して 2 倍以上の明確な増加が認められた。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、4-メチル-1-ペンテンは、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

Table 1 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (dose-finding test)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate				
		S9 (-)				
		TA 100	TA1535	WP2uvr A	TA 98	TA1537
Control ^a		97	6	18	10	5
4-Methyl-1-pentene	4.12	104 #	8 #	18 #	13 #	5 #
	12.3	100 #	6 #	12 #	17 #	7 #
	37.0	120 #	6 #	11 #	16 #	4 #
	111	96 #	3 #	11 #	12 #	9 #
	333	101 #	5 #	10 #	13 #	4 #
	1000	50 #	4 **	12 #	18 **	4 **
	3000	32 **	7 **	12 **	5 **	3 **
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	759	200	106	327	278

a : Dimethyl sulfoxide

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

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

NaN₃ : Sodium azide

Rev. : Revertants

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate

* : Growth inhibition

Table 2 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (dose-finding test)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate				
		S9(+)				
		TA 100	TA1535	WP2uvr A	TA 98	TA1537
Control ^a		138	7	19	20	8
4-Methyl-1-pentene	4.12	132 #	5 #	19 #	21 #	9 #
	12.3	142 #	11 #	15 #	29 #	5 #
	37.0	140 #	11 #	13 #	30 #	13 #
	111	130 #	4 #	24 #	25 #	9 #
	333	118 #	5 #	14 #	21 #	4 #
	1000	19 **	8 **	6 #	20 **	5 **
	3000	40 **	6 **	14 **	30 **	5 **
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate	1129	213	597	253	223

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate

* : Growth inhibition

Table 3 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (I)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9(-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		127 , 116 123 (122 $\pm$ 6)	7 , 8 6 (7 $\pm$ 1)	18 , 16 11 (15 $\pm$ 4)	15 , 13 8 (12 $\pm$ 4)	12 , 8 10 (10 $\pm$ 2)
4-Methyl-1-pentene	46.9	126 [#] , 120 [#] 117 [#] (121 $\pm$ 5)	8 [#] , 5 [#] 9 [#] (7 $\pm$ 2)	12 [#] , 18 [#] 17 [#] (16 $\pm$ 3)	10 [#] , 7 [#] 12 [#] (10 $\pm$ 3)	6 [#] , 11 [#] 12 [#] (10 $\pm$ 3)
	93.8	122 [#] , 109 [#] 100 [#] (110 $\pm$ 11)	6 [#] , 4 [#] 8 [#] (6 $\pm$ 2)	18 [#] , 10 [#] 12 [#] (13 $\pm$ 4)	10 [#] , 11 [#] 9 [#] (10 $\pm$ 1)	12 [#] , 6 [#] 4 [#] (7 $\pm$ 4)
	188	121 [#] , 112 [#] 87 [#] (107 $\pm$ 18)	10 [#] , 6 [#] 7 [#] (8 $\pm$ 2)	10 [#] , 17 [#] 14 [#] (14 $\pm$ 4)	4 [#] , 9 [#] 5 [#] (6 $\pm$ 3)	12 [#] , 12 [#] 12 [#] (12 $\pm$ 0)
	375	120 [#] , 117 [#] 120 [#] (119 $\pm$ 2)	4 [#] , 8 [#] 5 [#] (6 $\pm$ 2)	20 [#] , 25 [#] 20 [#] (22 $\pm$ 3)	7 [#] , 10 [#] 16 [#] (11 $\pm$ 5)	8 [#] , 2 [#] 8 [#] (6 $\pm$ 3)
	750	70 [#] , 110 [#] 85 [#] (88 $\pm$ 20)	3 ^{**} , 7 ^{**} 0 ^{**} (3 $\pm$ 4)	14 [#] , 7 [#] 6 [#] (9 $\pm$ 4)	13 [#] , 6 [#] 10 [#] (10 $\pm$ 4)	6 ^{**} , 8 ^{**} 8 ^{**} (7 $\pm$ 1)
	1500	24 ^{**} , 32 ^{**} 48 ^{**} (35 $\pm$ 12)	2 ^{**} , 6 ^{**} 3 ^{**} (4 $\pm$ 2)	8 ^{**} , 12 ^{**} 10 ^{**} (10 $\pm$ 2)	8 ^{**} , 8 ^{**} 4 ^{**} (7 $\pm$ 2)	12 ^{**} , 2 ^{**} 4 ^{**} (6 $\pm$ 5)
	3000	40 ^{**} , 28 ^{**} 35 ^{**} (34 $\pm$ 6)	5 ^{**} , 2 ^{**} 1 ^{**} (3 $\pm$ 2)	8 ^{**} , 6 ^{**} 8 ^{**} (7 $\pm$ 1)	7 ^{**} , 12 ^{**} 10 ^{**} (10 $\pm$ 3)	4 ^{**} , 8 ^{**} 2 ^{**} (5 $\pm$ 3)
		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
Positive control	Rev./plate (Mean $\pm$ S.D.)	1021 , 1126 824 (990 $\pm$ 153)	202 , 227 176 (202 $\pm$ 26)	95 , 110 106 (104 $\pm$ 8)	369 , 253 301 (308 $\pm$ 58)	243 , 222 219 (228 $\pm$ 13)

a : Dimethyl sulfoxide

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

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

NaN₃ : Sodium azide

Rev. : Revertants

[#] : Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate

^{*} : Growth inhibition

Table 4 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (I)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9(+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		136 , 145 117 (133 $\pm$ 14)	8 , 14 11 (11 $\pm$ 3)	20 , 14 17 (17 $\pm$ 3)	26 , 26 35 (29 $\pm$ 5)	8 , 12 10 (10 $\pm$ 2)
4-Methyl-1-pentene	46.9	123 [#] , 126 [#] 151 [#] (133 $\pm$ 15)	12 [#] , 13 [#] 7 [#] (11 $\pm$ 3)	22 [#] , 17 [#] 12 [#] (17 $\pm$ 5)	27 [#] , 22 [#] 26 [#] (25 $\pm$ 3)	24 [#] , 14 [#] 10 [#] (16 $\pm$ 7)
	93.8	136 [#] , 164 [#] 150 [#] (150 $\pm$ 14)	8 [#] , 12 [#] 7 [#] (9 $\pm$ 3)	26 [#] , 20 [#] 25 [#] (24 $\pm$ 3)	21 [#] , 34 [#] 32 [#] (29 $\pm$ 7)	22 [#] , 10 [#] 18 [#] (17 $\pm$ 6)
	188	149 [#] , 160 [#] 121 [#] (143 $\pm$ 20)	9 [#] , 6 [#] 10 [#] (8 $\pm$ 2)	27 [#] , 12 [#] 12 [#] (17 $\pm$ 9)	17 [#] , 22 [#] 21 [#] (20 $\pm$ 3)	10 [#] , 18 [#] 14 [#] (14 $\pm$ 4)
	375	121 [#] , 188 [#] 132 [#] (147 $\pm$ 36)	10 [#] , 12 [#] 10 [#] (11 $\pm$ 1)	23 [#] , 23 [#] 18 [#] (21 $\pm$ 3)	24 [#] , 28 [#] 27 [#] (26 $\pm$ 2)	4 [#] , 14 [#] 10 [#] (9 $\pm$ 5)
	750	52 [#] , 56 [#] 78 [#] (62 $\pm$ 14)	6 [#] *, 6 [#] * 5 [#] * (6 $\pm$ 1)	12 [#] , 14 [#] 12 [#] (13 $\pm$ 1)	26 [#] , 22 [#] 19 [#] (22 $\pm$ 4)	8 [#] *, 14 [#] * 14 [#] * (12 $\pm$ 3)
	1500	49 [#] *, 59 [#] * 60 [#] * (56 $\pm$ 6)	7 [#] *, 8 [#] * 7 [#] * (7 $\pm$ 1)	12 [#] *, 9 [#] * 12 [#] * (11 $\pm$ 2)	21 [#] *, 18 [#] * 17 [#] * (19 $\pm$ 2)	8 [#] *, 12 [#] * 20 [#] * (13 $\pm$ 6)
	3000	40 [#] *, 44 [#] * 59 [#] * (48 $\pm$ 10)	8 [#] *, 10 [#] * 6 [#] * (8 $\pm$ 2)	11 [#] *, 8 [#] * 8 [#] * (9 $\pm$ 2)	14 [#] *, 4 [#] * 15 [#] * (11 $\pm$ 6)	18 [#] *, 8 [#] * 0 [#] * (9 $\pm$ 9)
		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
Positive control	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate	1069 , 1062	245 , 213	705 , 604	253 , 264	223 , 283
	(Mean $\pm$ S.D.)	1255 (1129 $\pm$ 109)	197 (218 $\pm$ 24)	647 (652 $\pm$ 51)	278 (265 $\pm$ 13)	208 (238 $\pm$ 40)

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

[#] : Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate

* : Growth inhibition

Table 5 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (II)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean ± S.D.)				
		S9(-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		108 , 110 113 (110±3)	4 , 10 3 (6±4)	19 , 13 17 (16±3)	7 , 17 14 (13±5)	14 , 5 4 (8±6)
4-Methyl-1-pentene	46.9	137 # , 121 # 119 # (126±10)	6 # , 2 # 7 # (5±3)	16 # , 22 # 17 # (18±3)	10 # , 8 # 10 # (9±1)	2 # , 11 # 7 # (7±5)
	93.8	128 # , 128 # 118 # (125±6)	4 # , 1 # 8 # (4±4)	10 # , 11 # 13 # (11±2)	11 # , 18 # 13 # (14±4)	6 # , 9 # 3 # (6±3)
	188	104 # , 109 # 119 # (111±8)	4 # , 3 # 3 # (3±1)	14 # , 20 # 14 # (16±3)	9 # , 12 # 11 # (11±2)	4 # , 6 # 6 # (5±1)
	375	91 # , 101 # 94 # (95±5)	7 # , 6 # 5 # (6±1)	20 # , 12 # 12 # (15±5)	17 # , 10 # 14 # (14±4)	3 # , 1 # 4 # (3±2)
	750	56 # , 76 # 60 # (64±11)	3 **, 2 ** 3 ** (3±1)	8 # , 9 # 12 # (10±2)	3 **, 4 ** 8 ** (5±3)	2 **, 3 ** 5 ** (3±2)
	1500	38 **, 48 ** 34 ** (40±7)	3 **, 1 ** 7 ** (4±3)	10 **, 10 ** 5 ** (8±3)	7 **, 3 ** 5 ** (5±2)	2 **, 1 ** 0 ** (1±1)
	3000	38 **, 48 ** 32 ** (39±8)	3 **, 2 ** 1 ** (2±1)	5 **, 14 ** 6 ** (8±5)	7 **, 2 ** 8 ** (6±3)	2 **, 5 ** 1 ** (3±2)
		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
Positive	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
control	Rev./plate (Mean±S.D.)	697 , 731 656 (695±38)	238 , 253 290 (260±27)	118 , 123 98 (113±13)	239 , 368 202 (270±87)	178 , 289 292 (253±65)

a : Dimethyl sulfoxide

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

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

NaN₃ : Sodium azide

Rev. : Revertants

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate

* : Growth inhibition

Table 6 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (II)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9(+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		141 , 108 113 (121 $\pm$ 18)	5 , 7 7 (6 $\pm$ 1)	19 , 29 18 (22 $\pm$ 6)	22 , 22 17 (20 $\pm$ 3)	8 , 9 13 (10 $\pm$ 3)
4-Methyl-1-pentene	46.9	123 [#] , 136 [#] 128 [#] (129 $\pm$ 7)	7 [#] , 8 [#] 10 [#] (8 $\pm$ 2)	16 [#] , 14 [#] 22 [#] (17 $\pm$ 4)	33 [#] , 30 [#] 30 [#] (31 $\pm$ 2)	10 [#] , 9 [#] 9 [#] (9 $\pm$ 1)
	93.8	113 [#] , 138 [#] 138 [#] (130 $\pm$ 14)	12 [#] , 7 [#] 6 [#] (8 $\pm$ 3)	26 [#] , 18 [#] 17 [#] (20 $\pm$ 5)	29 [#] , 29 [#] 27 [#] (28 $\pm$ 1)	12 [#] , 9 [#] 10 [#] (10 $\pm$ 2)
	188	112 [#] , 125 [#] 119 [#] (119 $\pm$ 7)	9 [#] , 4 [#] 6 [#] (6 $\pm$ 3)	17 [#] , 20 [#] 20 [#] (19 $\pm$ 2)	32 [#] , 21 [#] 30 [#] (28 $\pm$ 6)	6 [#] , 5 [#] 9 [#] (7 $\pm$ 2)
	375	126 [#] , 132 [#] 112 [#] (123 $\pm$ 10)	6 [#] , 6 [#] 11 [#] (8 $\pm$ 3)	15 [#] , 19 [#] 18 [#] (17 $\pm$ 2)	33 [#] , 21 [#] 30 [#] (28 $\pm$ 6)	2 [#] , 13 [#] 9 [#] (8 $\pm$ 6)
	750	74 ^{**} , 84 ^{**} 66 ^{**} (75 $\pm$ 9)	4 ^{**} , 8 ^{**} 6 ^{**} (6 $\pm$ 2)	14 [#] , 15 [#] 14 [#] (14 $\pm$ 1)	38 ^{**} , 17 ^{**} 13 ^{**} (23 $\pm$ 13)	2 ^{**} , 6 ^{**} 8 ^{**} (5 $\pm$ 3)
	1500	69 ^{**} , 77 ^{**} 61 ^{**} (69 $\pm$ 8)	6 ^{**} , 5 ^{**} 5 ^{**} (5 $\pm$ 1)	18 ^{**} , 11 ^{**} 9 ^{**} (13 $\pm$ 5)	24 ^{**} , 13 ^{**} 20 ^{**} (19 $\pm$ 6)	15 ^{**} , 4 ^{**} 10 ^{**} (10 $\pm$ 6)
	3000	62 ^{**} , 74 ^{**} 59 ^{**} (65 $\pm$ 8)	10 ^{**} , 4 ^{**} 11 ^{**} (8 $\pm$ 4)	6 ^{**} , 10 ^{**} 12 ^{**} (9 $\pm$ 3)	14 ^{**} , 19 ^{**} 20 ^{**} (18 $\pm$ 3)	6 ^{**} , 2 ^{**} 7 ^{**} (5 $\pm$ 3)
		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
Positive	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
control	Rev./plate (Mean $\pm$ S.D.)	1328 , 1629 1536 (1498 $\pm$ 154)	199 , 205 220 (208 $\pm$ 11)	649 , 731 669 (683 $\pm$ 43)	237 , 235 253 (242 $\pm$ 10)	272 , 249 310 (277 $\pm$ 31)

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

[#] : Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate

^{*} : Growth inhibition

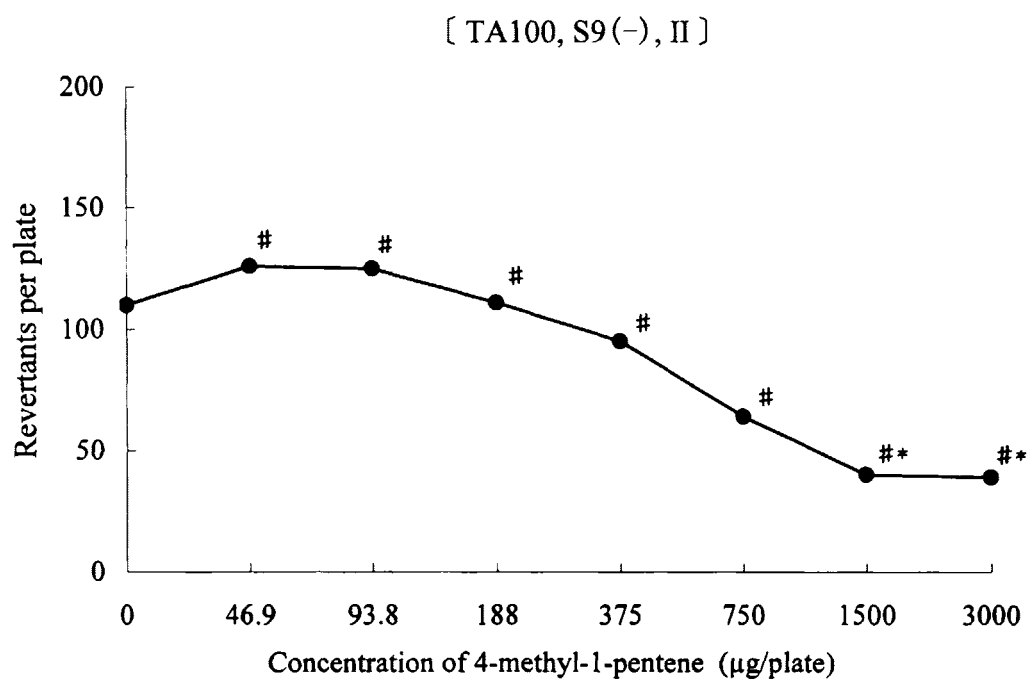
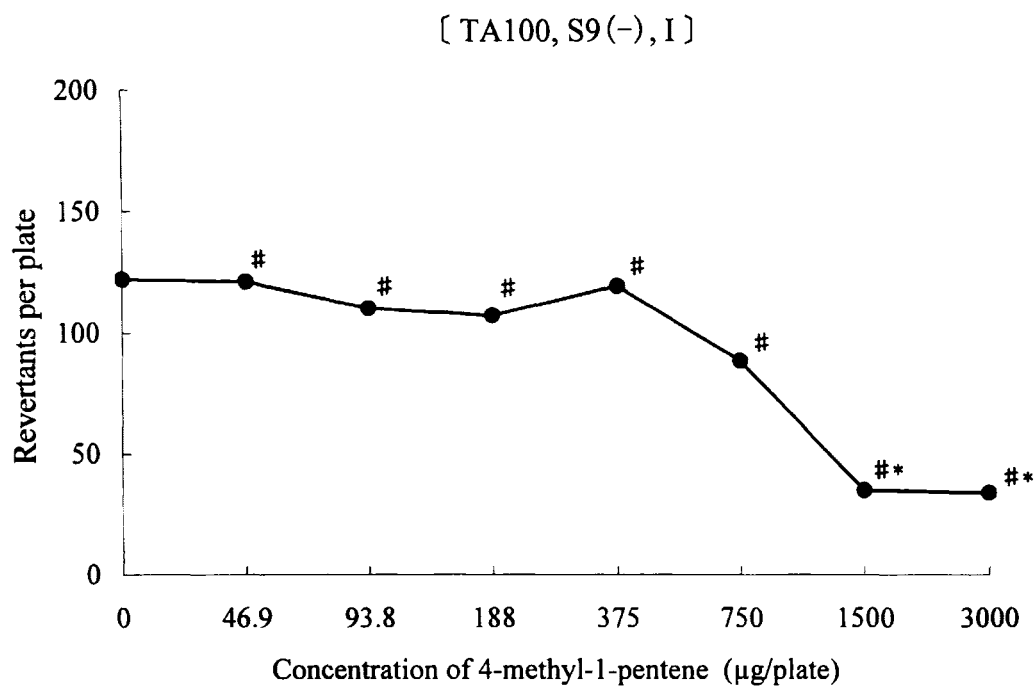


Figure 1-1 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation (dose-response curves)

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate

* : Growth inhibition

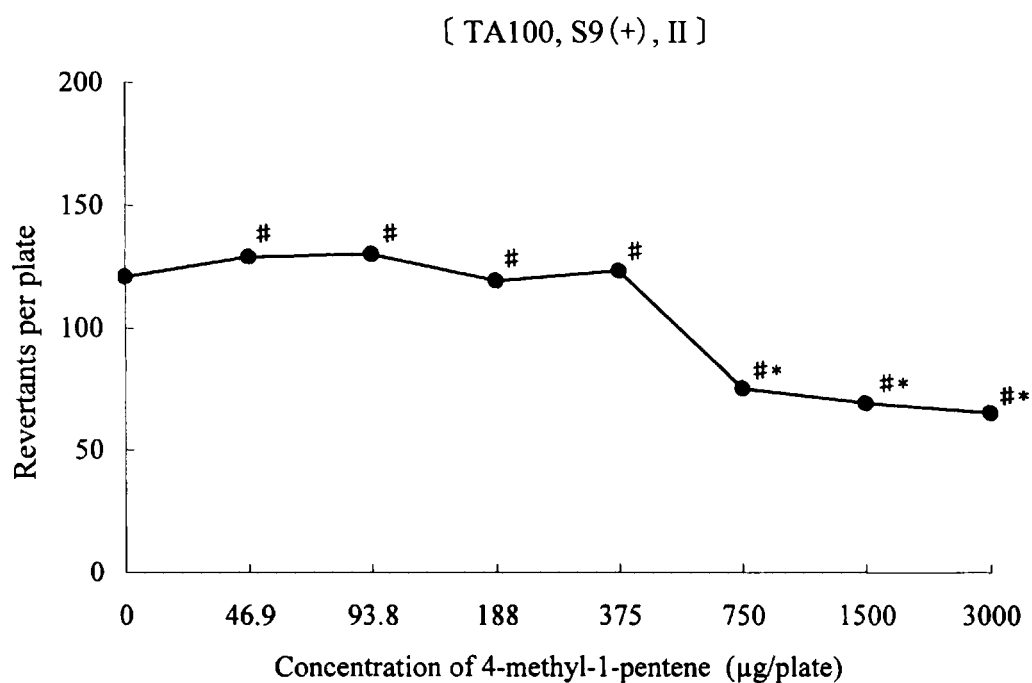
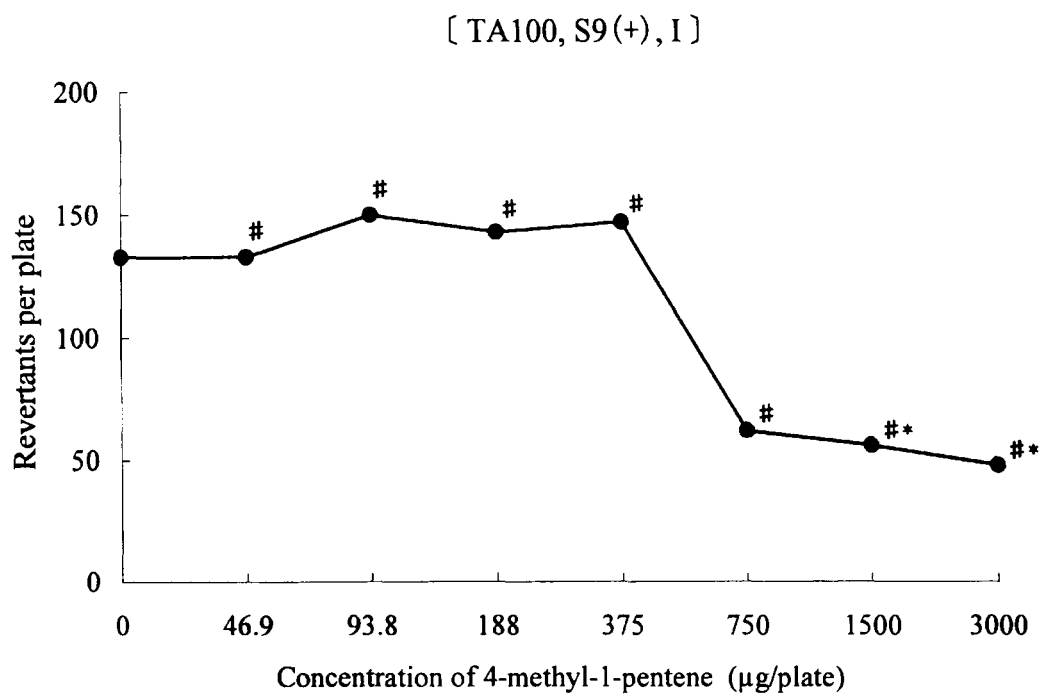


Figure 1-2 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA100 with metabolic activation (dose-response curves)

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate

* : Growth inhibition

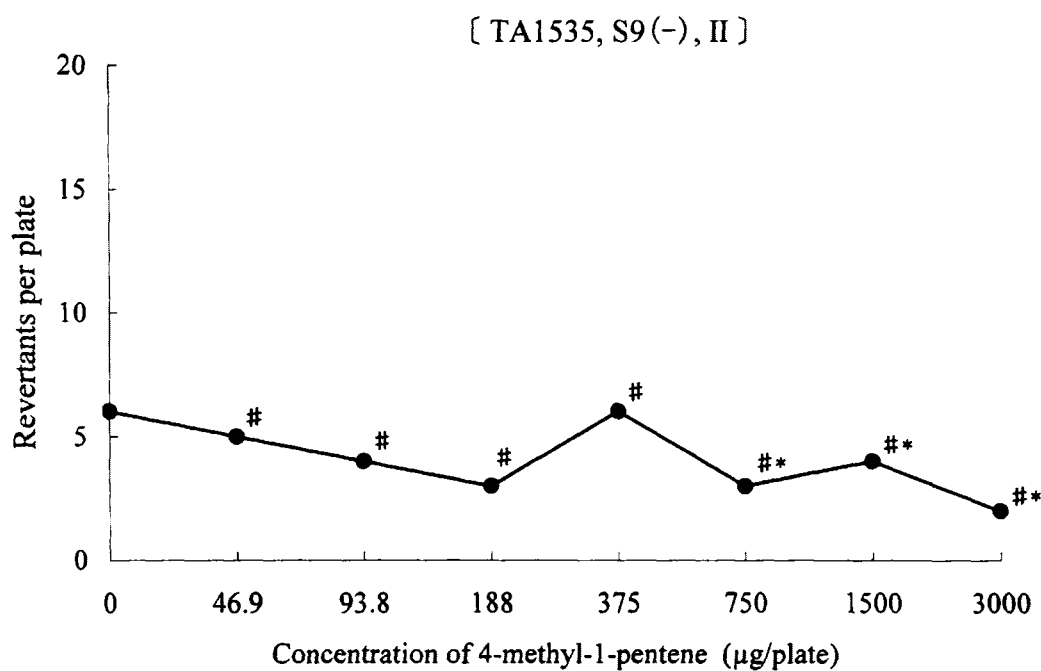
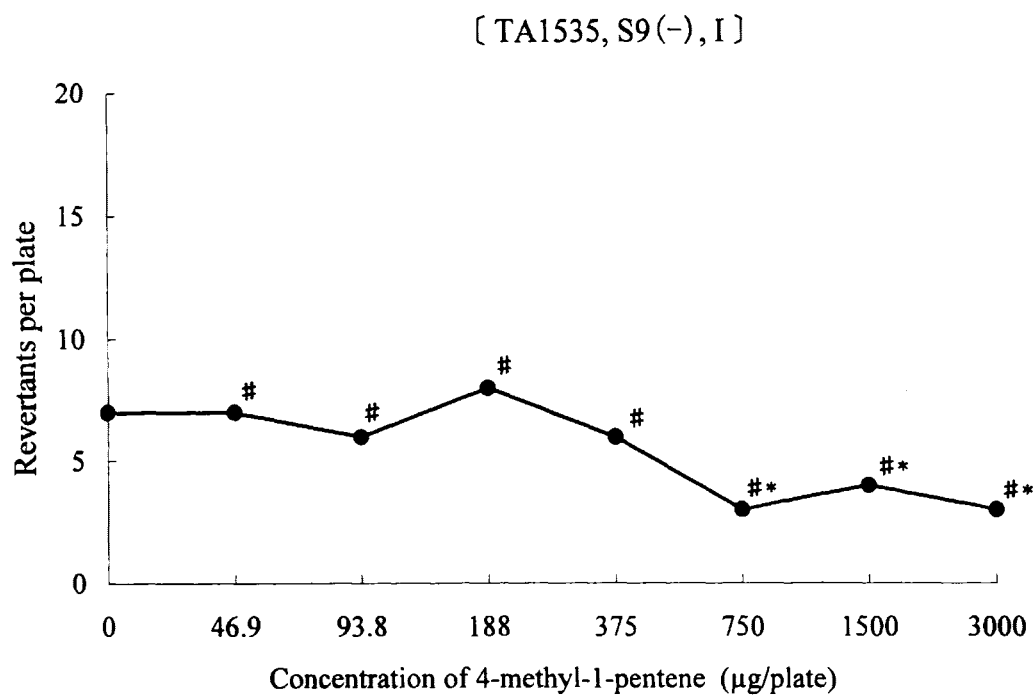


Figure 2-1 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA1535 without metabolic activation (dose-response curves)

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate
 * : Growth inhibition

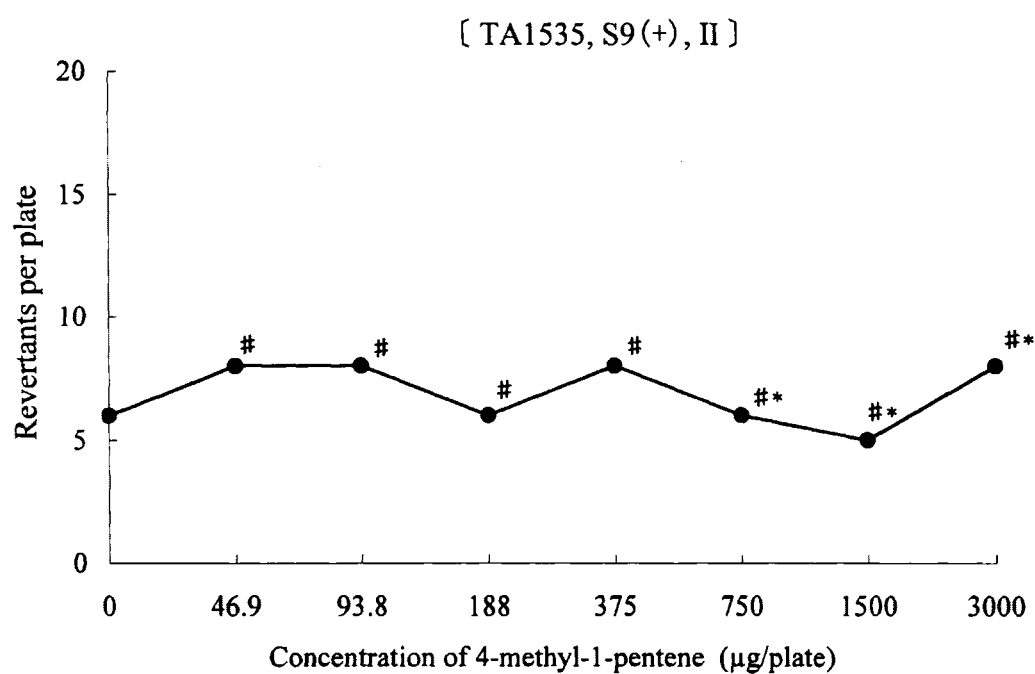
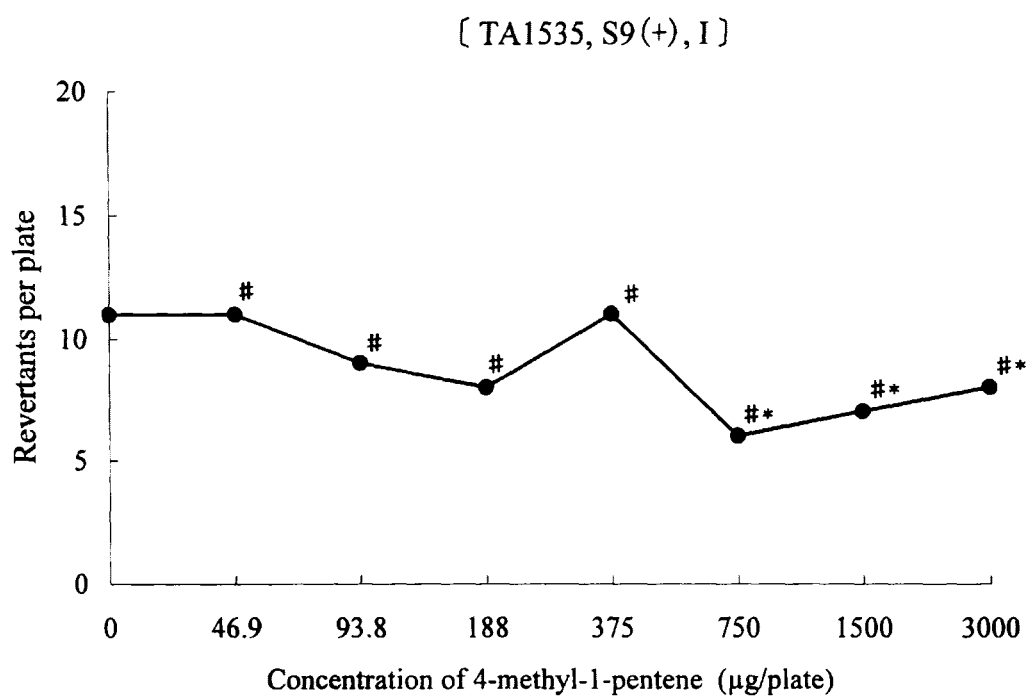


Figure 2-2 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA1535 with metabolic activation (dose-response curves)

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate

* : Growth inhibition

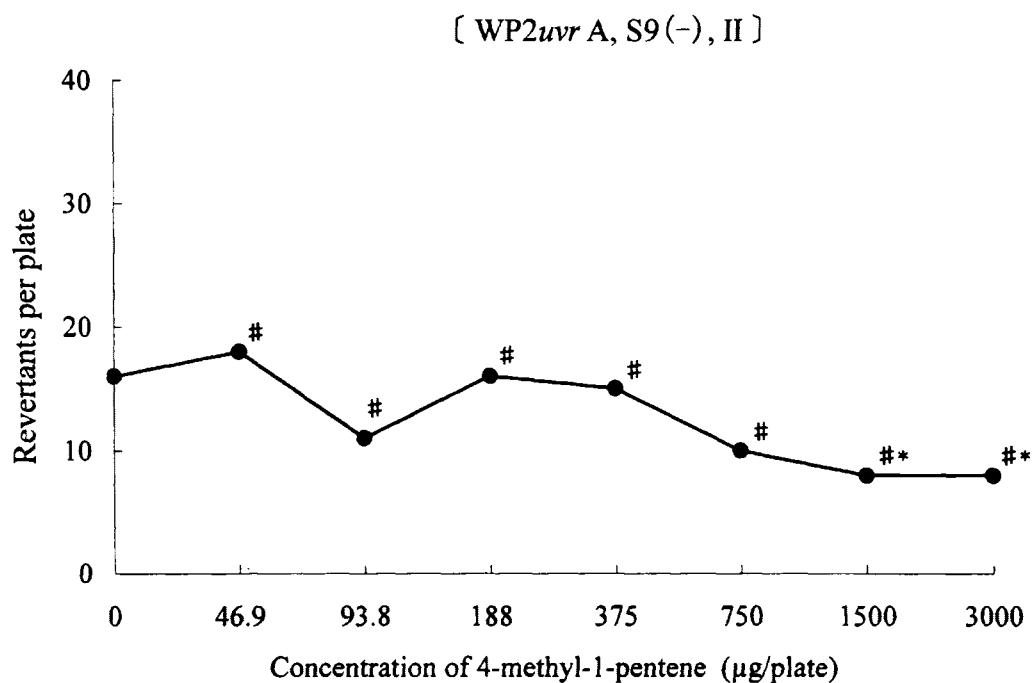
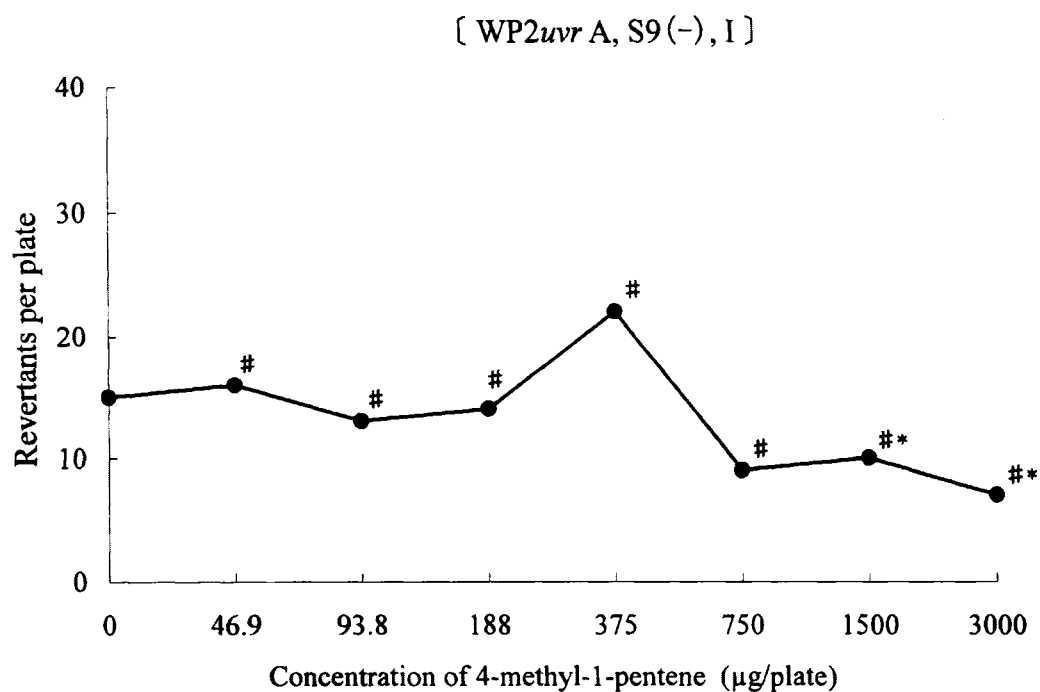


Figure 3-1 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Escherichia coli* WP2*uvr* A without metabolic activation (dose-response curves)

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate
 * : Growth inhibition

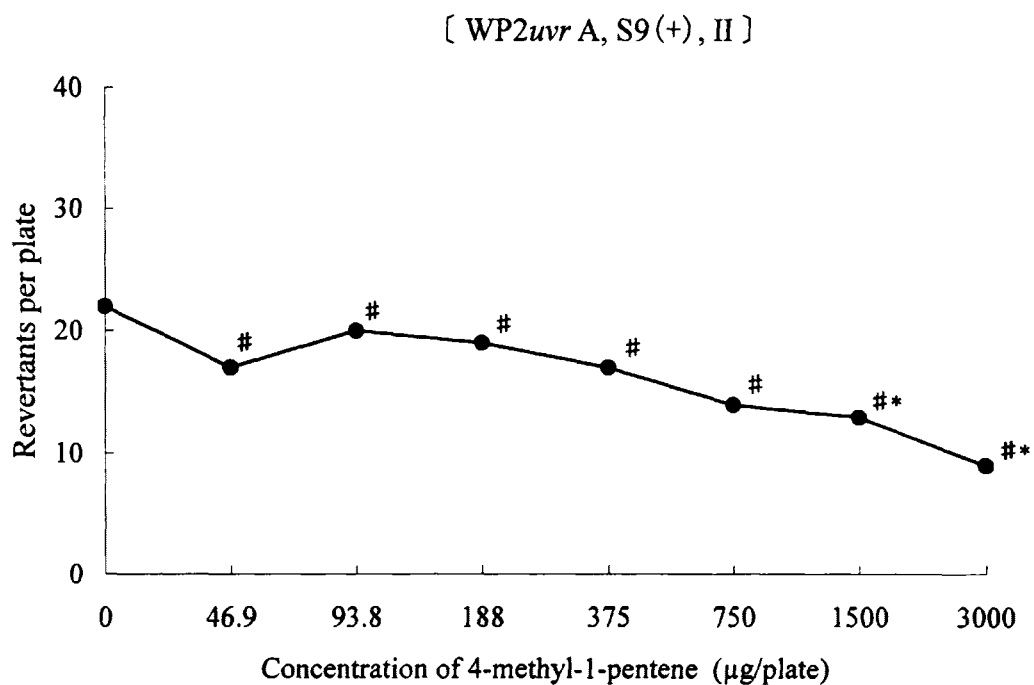
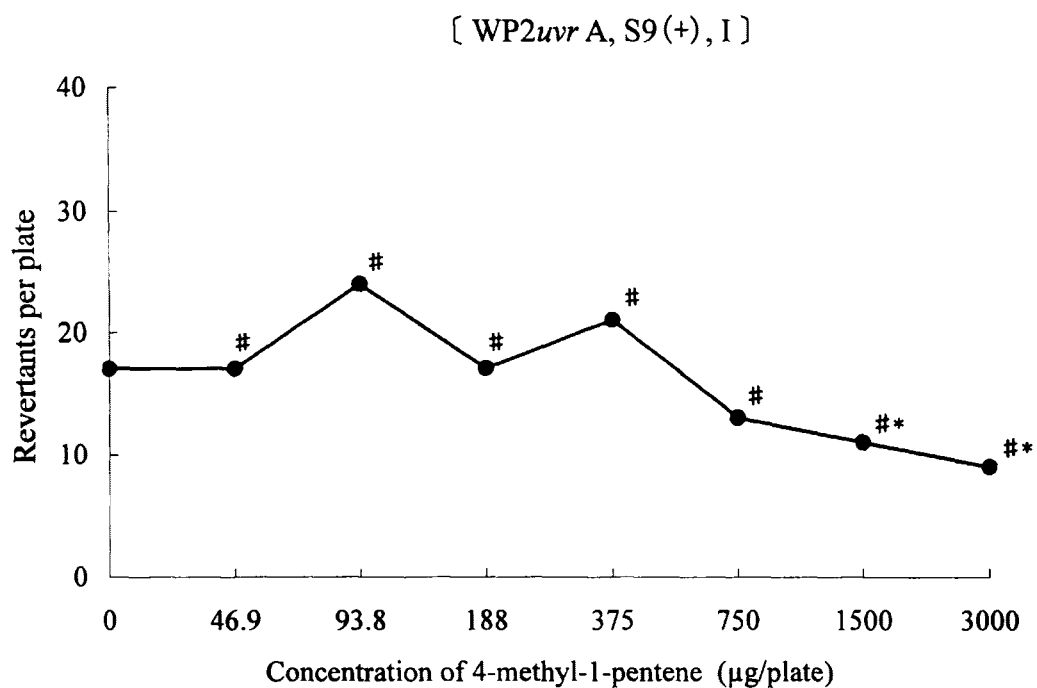
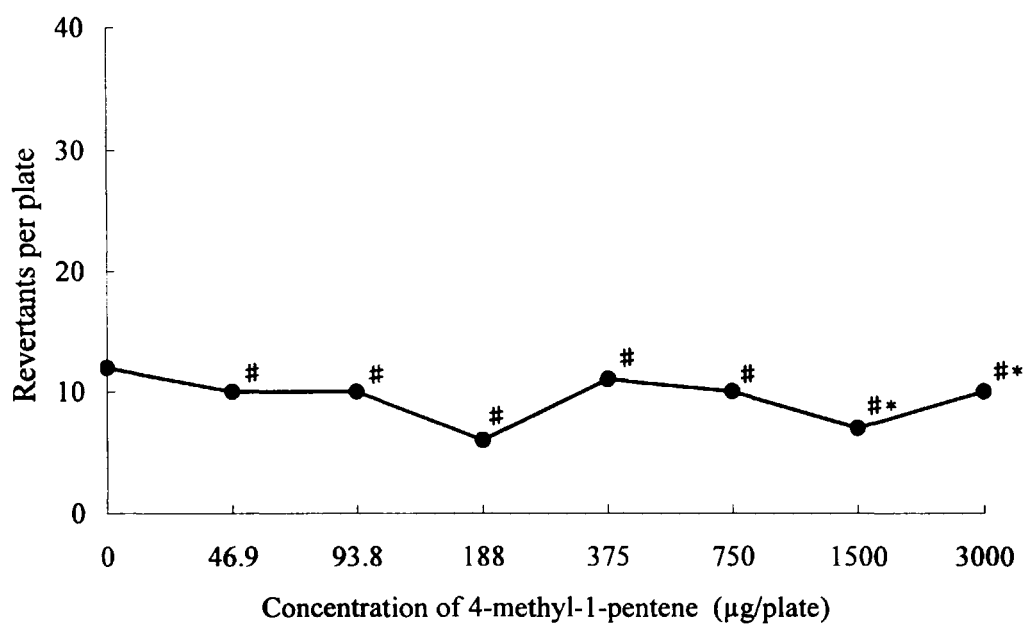


Figure 3-2 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (dose-response curves)

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate
 * : Growth inhibition

[TA98, S9(-), I]



[TA98, S9(-), II]

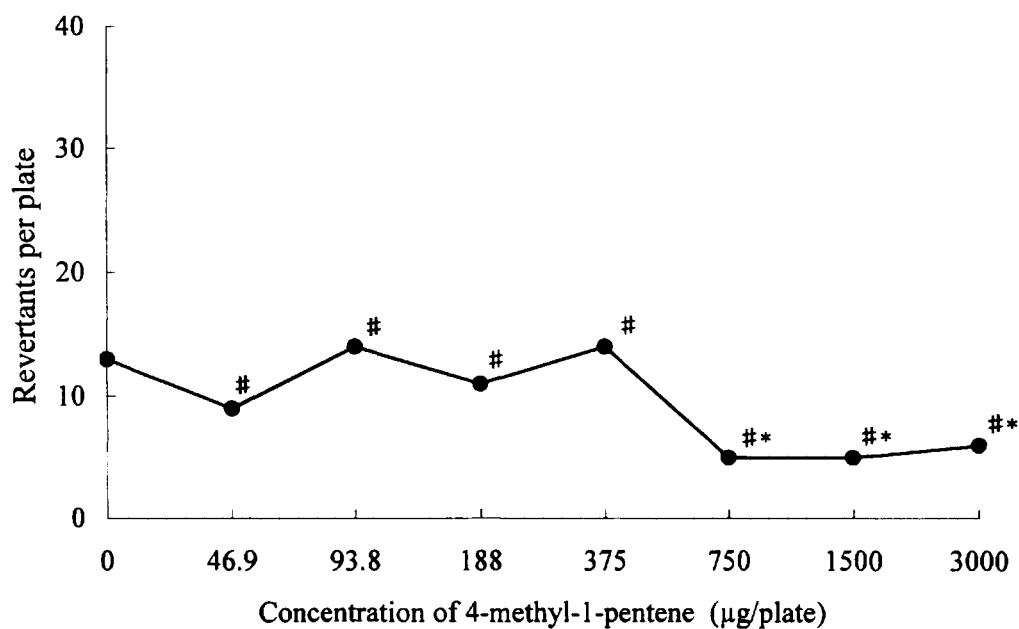


Figure 4-1 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (dose-response curves)

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate

* : Growth inhibition

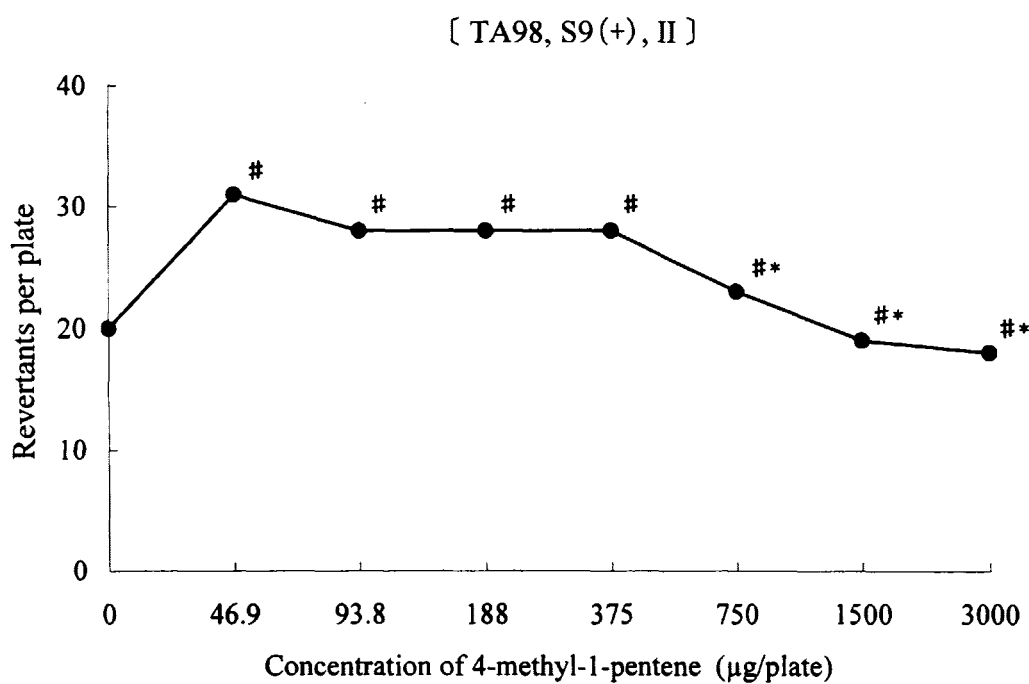
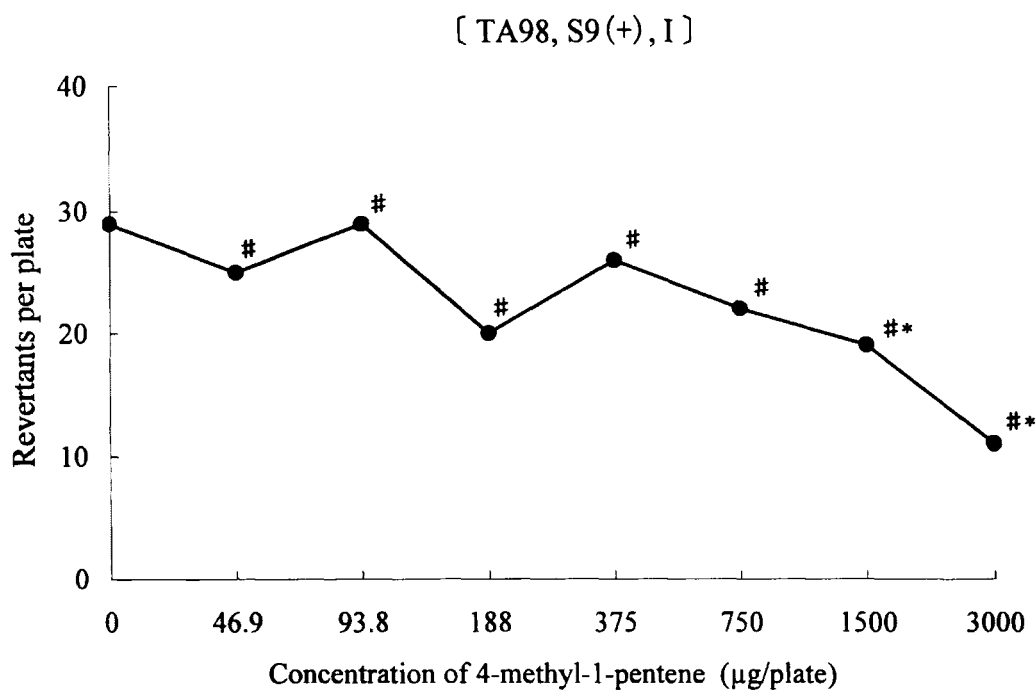


Figure 4-2 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA98 with metabolic activation (dose-response curves)

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate
 * : Growth inhibition

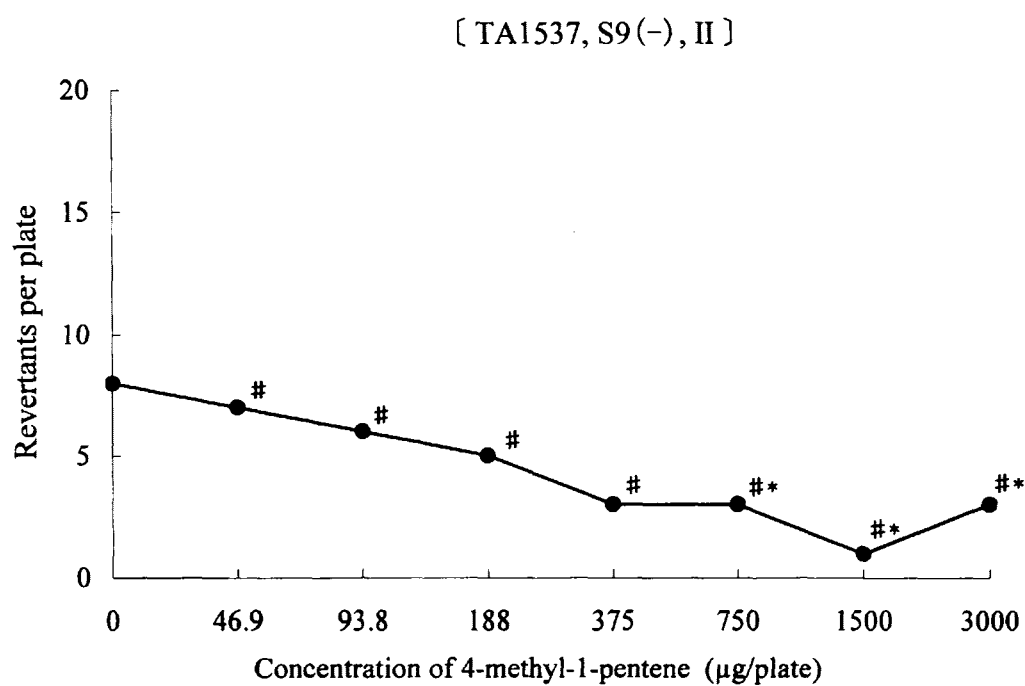
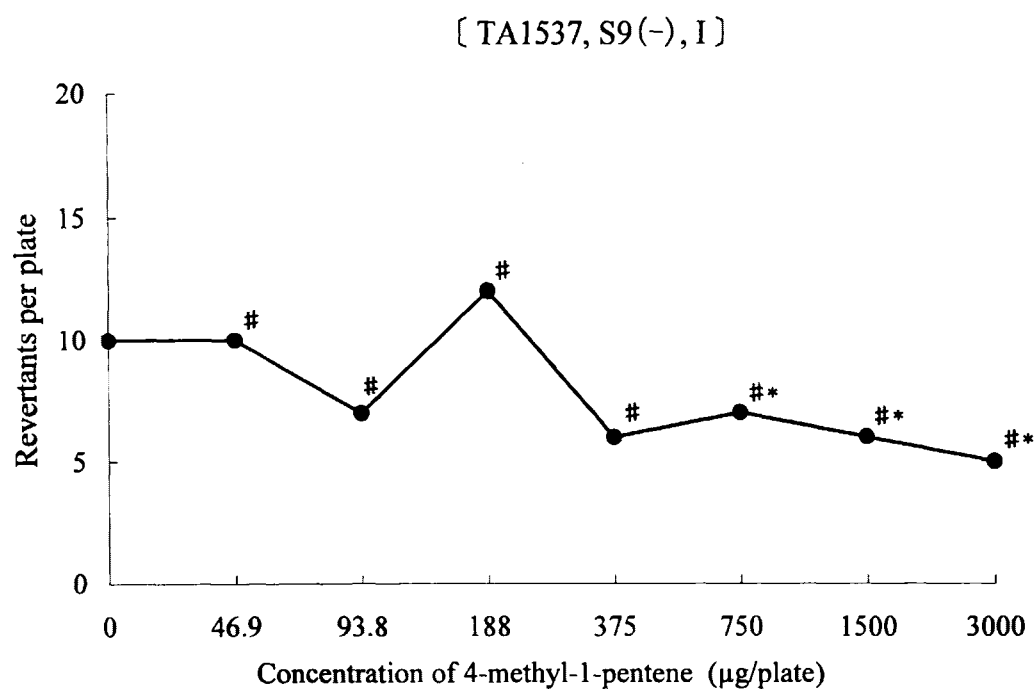


Figure 5-1 Reverse mutation test of 4-methyl-1-pentene in *Salmonella typhimurium* TA1537 without metabolic activation (dose-response curves)

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate
 * : Growth inhibition

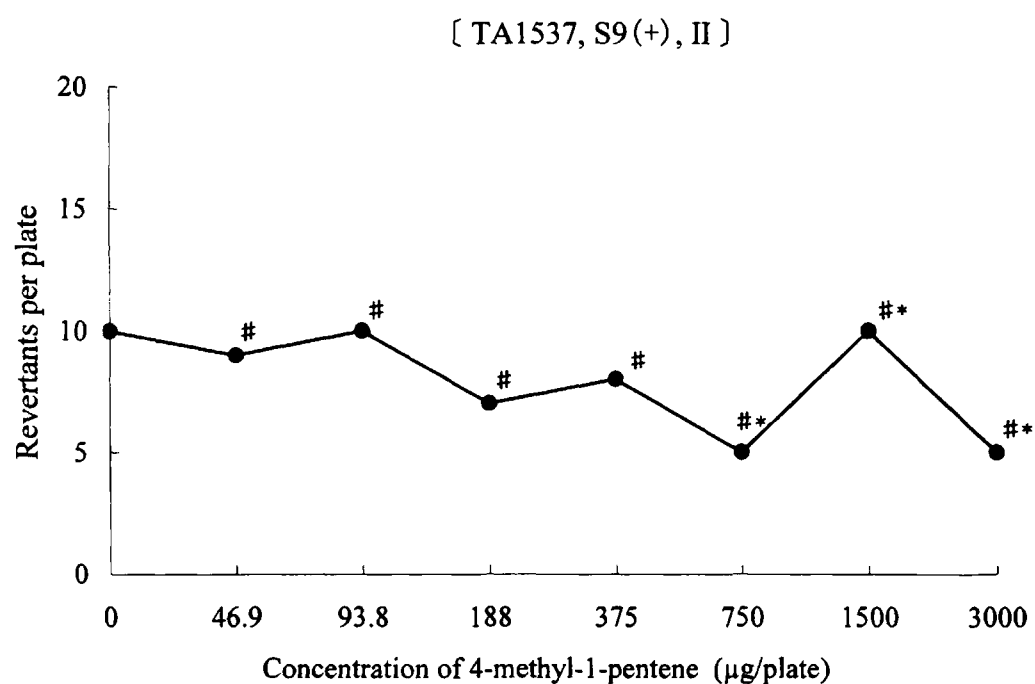
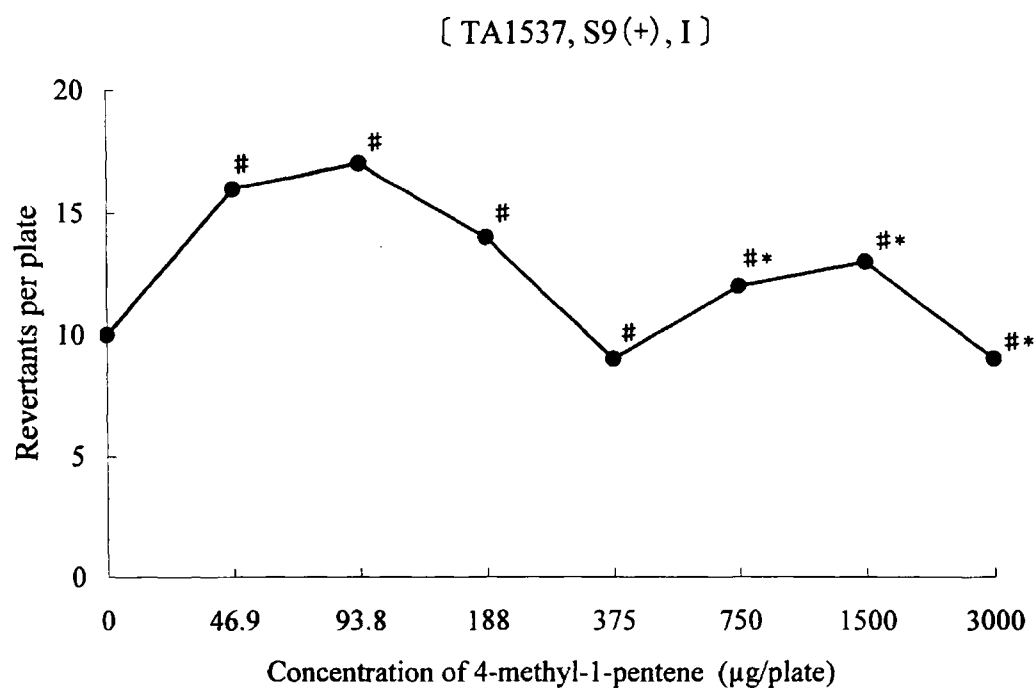


Figure 5-2 Reverse mutation test of 4-methyl-1-penten in *Salmonella typhimurium* TA1537 with metabolic activation (dose-response curves)

: Oil membrane-like precipitation on the surface of agar plate
 * : Growth inhibition