

3,4-ジクロロ-1-ブテンの
細菌を用いる
復帰突然変異試験

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	9
Tables 1～5	

【要 約】

3,4-ジクロロ-1-ブテ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、陽性の結果を得た。

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 µg/プレートで用量で行ったところ、S9 mix 無添加試験でWP2 *uvrA* とTA1537の1500 µg/プレート以上、その他の3菌株では5000 µg/プレートで、またS9 mix 添加試験ではTA1535、WP2 *uvrA*、TA1537で1500 µg/プレート以上、他の2菌株では5000 µg/プレートの用量で抗菌性が認められた。またTA100およびTA1535についてはS9 mix 無添加、添加のいずれの試験においても、変異コロニー数が増加する傾向にあった。そこで、本試験での最高用量をS9 mix 無添加、添加のいずれの条件についても2500 µg/プレート（S9 mix 添加のTA100およびTA98のみそれぞれ3000 µg/プレートおよび5000 µg/プレート）とし、TA100とTA1535の2菌株は等差で、その他の3菌株は公比2で用量を設定した。しかし1回目の本試験において用量設定試験よりもさらに低い濃度において抗菌性が認められた菌株が多かったため、最高用量をさらに1~2段階低くして、いずれの菌株においても再現性の確認ができるまで試験を行った。

その結果、用いた5種類の検定菌のうちTA1535のS9 mix 無添加、添加試験のいずれも溶媒対照値の2倍以上となる用量依存性のある復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性も確認されたことから、3,4-ジクロロ-1-ブテンは、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）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、3,4-ジクロロ-1-ブテンについて、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

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 pKM101 (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〕

3,4-ジクロロ-1-ブテン (DB、CAS No. 760-23-6) は、分子量 124.99 の無色透明 (購入時は淡黄色) 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 ロット番号 純度 99% (不純物: 不明) のものを購入した。被験物質は、使用時まで冷蔵保管した。

DBは、アセトン (ロット番号: DSM4173 および KCL7177、和光純薬工業(株)) に 50 mg/ml となるよう溶解した後、同溶媒で公比約 3 ないし 2、あるいは等差で希釈し、速やかに試験に用いた。

DB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 (0.500 mg/ml) 溶液は当研究所で実施した染色体異常試験(G-94-021) で調製したものについて、また高濃度 (50.0 mg/ml) 溶液は当該試験の本試験 I 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、105 および 100%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 I 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、調製液の濃度は、いずれも当研究所の規定している基準内（溶媒中での平均含量が添加量の90～110%）であった（Appendix 4）。

〔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 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。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。

1) 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日製造および DJ040KJ、1994年11月21日製造、DJ010BK、1995年2月6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、RAA-321、1995年 1 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、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 2 回実施し、さらに再現性試験を行い結果の再現性を確認した。

〔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。DB について 50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 として、試験を実施したところ、S9 mix 無添加試験では WP2 *uvrA*、TA1537 において 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、その他は 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で、また S9 mix 添加試験では TA1535、WP2 *uvrA*、TA1537 において 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、他の 2 菌株では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められた。

なお、TA100 および TA1535 では S9 mix の添加にかかわらず、変異コロニー数の増加が認められたため、TA100 の S9 mix 添加試験は 3000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、その他は 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高用量とし等差で用量を設定することとした。その他の 3 菌株の本試験における最高用量は S9 mix 無添加試験、添加試験のいずれも 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA98 の S9 mix 添加試験のみ 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) とした。

〔本試験および再現性試験〕

本試験 I の結果を Table 2-1、2-2 に示した。TA1535 の S9 mix 添加試験で 1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で溶媒対照値の 2 倍以上の変異コロニー数が認められた。TA100 の S9 mix 添加試験では、変異コロニー数の増加が認められたものの、溶媒対照値の 2 倍に満たなかったため、さらに用量の間隔を狭めて本試験 II を実施することとした。また TA1535 についても TA100 と同一の用量で S9 mix 添加試験のみ最高用量を 1 用量低くすることとした。TA1537 の S9 mix 無添加試験では変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、S9 mix 無添加試験では TA1537 を除く 4 菌株で、S9 mix 添加試験では TA100、TA1535 を除く 3 菌株で抗菌性を示さない用量が 4 用量に満たなかったため、それぞれ最高用量を低くして本試験 II および再現性試験を行うこととした。

本試験 II の各検定菌の用量および結果を Table 3-1、3-2 に示した。TA100 の S9 mix 無添加試験および TA1535 の S9 mix 無添加、添加の両試験で溶媒対照値の 2 倍以上の変異コロニー数が認められた。TA100 の S9 mix 添加試験では変異コロニー数の増加が認められたものの本試験 I と同様、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。WP2 *uvrA*、TA98、TA1537 は S9 mix 無添加、添加のいずれの試験も

用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。

再現性試験は S9 mix 無添加試験では TA100、TA1535、WP2 *uvrA*、TA98 について、S9 mix 添加試験では、WP2 *uvrA*、TA98、TA1537 について本試験Ⅱと同一用量で行った。その結果、TA1535 は溶媒対照値の 2 倍以上となる用量依存性のある変異コロニー数の増加が認められたが、その他は溶媒対照値の 2 倍以上の変異コロニー数の増加は認められなかった (Table 4-1、4-2)。TA100 については、変異コロニー数の増加は認められたものの溶媒対照値の 2 倍に満たなかったことから、さらに同一用量で再現性の確認を行い、変異コロニー数が溶媒対照値の 2 倍とならないことを確認した (Table 5)。

TA1535 の最大比活性は S9 mix 無添加試験では 62.5、S9 mix 添加試験では 25.0 であった (Appendix 5)。

DB 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、3,4-ジクロロ-1-ブテンは、用いた試験系において変異原性を有するもの (陽性) 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 3,4-dichloro-1-butene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mea± S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	105	135	133	15	11	9	23	21	19	27	34	37	9	8	10	
		(124± 16.8)			(12± 3.1)			(21± 2.0)			(33± 5.1)			(9± 1.0)			
	50	135			11			17			14			6			
	150	138			7			12			8			8			
	500	180			31			17			24			6			
	1500	360			69			17 *			45			10 *			
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			4 *			
S9mix (+)	0	125	106	112	9	8	11	27	16	25	34	34	34	7	14	7	
		(114± 9.7)			(9± 1.5)			(23± 5.9)			(34± 0.0)			(9± 4.0)			
	50	128			16			29			37			14			
	150	154			15			21			41			10			
	500	150			18			12			38			9			
	1500	219			34 *			8 *			30			6 *			
	5000	389 *			91 *			6 *			17 *			9 *			
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			
	Number of colonies / plate	1154	1249	1225	186	200	230	823	998	989	489	486	501	325	339	362	
		(1209± 49.4)			(205± 22.5)			(937± 98.5)			(492± 7.9)			(342± 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% and impurity was unknown.

Table 2-1. Results of reverse mutation test (I) of 3,4-dichloro-1-butene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, $\text{Me}\pm$ S.D.)								
		Base - pair substitution type								
		TA100			TA1535					
S9mix (-)	0	127	126	120	20	15	13			
		(124 \pm 3.8)			(16 \pm 3.6)					
	500	183	206	190	26	21	11			
		(193 \pm 11.8)			(19 \pm 7.6)					
	1000	110 *	128 *	98 *	22 *	19 *	13 *			
		(112 \pm 15.1)			(18 \pm 4.6)					
	1500	0 *	0 *	0 *	20 *	12 *	16 *			
		(0 \pm 0.0)			(16 \pm 4.0)					
2000	0 *	0 *	0 *	18 *	0 *	0 *				
	(0 \pm 0.0)			(6 \pm 10.4)						
2500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *				
	(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)						
S9mix (+)	0	158	149	168	23	24	11			
		(158 \pm 9.5)			(19 \pm 7.2)					
	500	ND			28	29	25			
					(27 \pm 2.1)					
	1000	196	174	200	47	41	44			
		(190 \pm 14.0)			(44 \pm 3.0)					
	1500	239	231	205	45	53	41			
		(225 \pm 17.8)			(46 \pm 6.1)					
2000	213	245	237	75	52	63				
	(232 \pm 16.7)			(63 \pm 11.5)						
2500	243	220	226	66 *	66 *	74 *				
	(230 \pm 11.9)			(69 \pm 4.6)						
3000	290 *	275 *	313 *							
	(293 \pm 19.1)									
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA					
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5					
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA					
	Dose (μg /plate)	1			2					
	Number of colonies / plate	868	803	830	170	165	175			
		(834 \pm 32.7)			(170 \pm 5.0)					
	Number of colonies / plate	1352	1209	1238	270	316	300			
		(1266 \pm 75.6)			(295 \pm 23.4)					

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

** : Purity was 99% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 2-2. Results of reverse mutation test (I) of 3,4-dichloro-1-butene ** 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					
		WP2uvrA			TA98			TA1537					
S9mix (-)	0			16	23	23	25	34	21	6	8	8	
				(21 ± 4.0)			(27 ± 6.7)			(7 ± 1.2)			
	156			24	33	22	19	30	17	5	7	4	
				(26 ± 5.9)			(22 ± 7.0)			(5 ± 1.5)			
	313			30	24	27	30	17	22	9	4	5	
				(27 ± 3.0)			(23 ± 6.6)			(6 ± 2.6)			
	625			28	17	30	14 *	15 *	17 *	6	6	8	
				(25 ± 7.0)			(15 ± 1.5)			(7 ± 1.2)			
S9mix (+)	1250			27	27	18 *	0 *	0 *	20 *	6	7	3	
				(24 ± 5.2)			(7 ± 11.5)			(5 ± 2.1)			
	2500			0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
				(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			
S9mix (+)	0			28	24	21	37	30	24	29	14	20	
				(24 ± 3.5)			(30 ± 6.5)			(21 ± 7.5)			
	156			27	35	32	ND			6	12	13	
				(31 ± 4.0)						(10 ± 3.8)			
	313			31	38	26	31	43	41	13	10	13	
				(32 ± 6.0)			(38 ± 6.4)			(12 ± 1.7)			
	625			26	25	32	25	33	27	13	3	12	
				(28 ± 3.8)			(28 ± 4.2)			(9 ± 5.5)			
S9mix (+)	1250			24 *	0 *	0 *	4 *	0 *	0 *	5 *	0 *	0 *	
				(8 ± 13.9)			(1 ± 2.3)			(2 ± 2.9)			
	2500			0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)				
	5000					0 *	0 *	0 *					
						(0 ± 0.0)							
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate			1214	1213	1269	420	373	374	243	212	142	
				(1232 ± 32.0)			(389 ± 26.9)			(199 ± 51.7)			

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 3-1. Results of reverse mutation test (II) of 3,4-dichloro-1-butene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Me ± S.D.)								
		Base - pair substitution type								
		TA100			TA1535					
S9mix (-)	0	137	126	185	22	10	12			
		(149 ± 31.4)			(15 ± 6.4)					
	250	364	397	384	19	34	32			
		(382 ± 16.6)			(28 ± 8.1)					
	400	464	314	326	38	40	41			
		(368 ± 83.4)			(40 ± 1.5)					
	550	304	309	306	38	36	38			
		(306 ± 2.5)			(37 ± 1.2)					
700	339	493	469	29	30	26				
	(434 ± 82.9)			(28 ± 2.1)						
850	269 *	311 *	139 *	33	19	29				
	(240 ± 89.7)			(27 ± 7.2)						
1000	55 *	7 *	0 *	8 *	0 *	0 *				
	(21 ± 29.9)			(3 ± 4.6)						
S9mix (+)	0	161	192	170	19	18	16			
		(174 ± 15.9)			(18 ± 1.5)					
	1000	ND			41	33	41			
					(38 ± 4.6)					
	1200	199	199	198	42	47	41			
		(199 ± 0.6)			(43 ± 3.2)					
	1400	183	229	204	55	44	61			
		(205 ± 23.0)			(53 ± 8.6)					
1600	235	239	208	56	57	48				
	(227 ± 16.9)			(54 ± 4.9)						
1800	237	226	192	42	58	64				
	(218 ± 23.5)			(55 ± 11.4)						
2000	236	258	227	60 *	57 *	48 *				
	(240 ± 15.9)			(55 ± 6.2)						
2200	224 *	251 *	217 *	ND						
	(231 ± 18.0)									
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA					
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5					
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA					
	Dose (µg /plate)	1			2					
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	794	787	840	172	181	159			
		(807 ± 28.8)			(171 ± 11.1)					
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1418	1526	1543	299	297	298			
		(1496 ± 67.8)			(298 ± 1.0)					

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

** : Purity was 99% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 3-2. Results of reverse mutation test (II) of 3,4-dichloro-1-butene ** 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					
		WP2uvrA			TA98			TA1537					
S9mix (-)	0			18	19	23	19	22	16	13	16	8	
				(20 ± 2.6)			(19 ± 3.0)			(12 ± 4.0)			
	39			27	28	29	ND			6	11	7	
				(28 ± 1.0)						(8 ± 2.6)			
	78			24	17	36	27	25	28	8	6	10	
				(26 ± 9.6)			(27 ± 1.5)			(8 ± 2.0)			
	156			27	33	38	20	35	21	9	9	9	
				(33 ± 5.5)			(25 ± 8.4)			(9 ± 0.0)			
	313			26	30	24	0	22	21	5	1	9	
			(27 ± 3.1)			(14 ± 12.4)			(5 ± 4.0)				
625			11	27	31	31	33	23	5	7	0 *		
			(23 ± 10.6)			(29 ± 5.3)			(4 ± 3.6)				
1250			35 *	36 *	29 *	12 *	16 *	26 *	5 *	4 *	9 *		
			(33 ± 3.8)			(18 ± 7.2)			(6 ± 2.6)				
2500						26 *	0 *	0 *					
						(9 ± 15.0)							
S9mix (+)	0			21	31	33	34	26	34	18	21	16	
				(28 ± 6.4)			(31 ± 4.6)			(18 ± 2.5)			
	39			23	31	18	35	34	50	21	14	15	
				(24 ± 6.6)			(40 ± 9.0)			(17 ± 3.8)			
	78			30	37	34	37	46	39	19	18	16	
				(34 ± 3.5)			(41 ± 4.7)			(18 ± 1.5)			
	156			32	32	29	50	37	29	16	22	19	
				(31 ± 1.7)			(39 ± 10.6)			(19 ± 3.0)			
	313			39	10	37	45	36	44	18	15	15	
			(29 ± 16.2)			(42 ± 4.9)			(16 ± 1.7)				
625			23	25	13	37	48	30	4	14	18		
			(20 ± 6.4)			(38 ± 9.1)			(12 ± 7.2)				
1250			28 *	21 *	32 *	45 *	31 *	34 *	13 *	9 *	17 *		
			(27 ± 5.6)			(37 ± 7.4)			(13 ± 4.0)				
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)			0.01			0.1			80			
	Number of colonies / plate			217	195	204	932	901	970	942	913	905	
			(205 ± 11.1)			(934 ± 34.6)			(920 ± 19.5)				
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)			10			0.5			2			
	Number of colonies / plate			1569	1540	1512	321	299	319	256	270	235	
			(1540 ± 28.5)			(313 ± 12.2)			(254 ± 17.6)				

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 4-1. Results of confirmation test (I) in reverse mutation test of 3,4-dichloro-1-butene ** 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								
		TA100			TA1535					
S9mix (-)	0	155	141	149	15	20	13			
		(148 ± 7.0)			(16 ± 3.6)					
	250	183	162	214	14	23	22			
		(186 ± 26.2)			(20 ± 4.9)					
	400	179	238	248	32	30	36			
		(222 ± 37.3)			(33 ± 3.1)					
	550	230	287	274	29	26	34			
		(264 ± 29.9)			(30 ± 4.0)					
S9mix (-)	700	295	278	272	38	39	29			
		(282 ± 11.9)			(35 ± 5.5)					
	850	264	277	273	52	45	48			
	(271 ± 6.7)			(48 ± 3.5)						
	1000	352 *	285 *	228 *	49	51	36 *			
		(288 ± 62.1)			(45 ± 8.1)					
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA					
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5					
	Number of colonies / plate	706	767	713	181	170	183			
		(729 ± 33.4)			(178 ± 7.0)					

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.

Table 4-2. Results of confirmation test (I) in reverse mutation test of 3,4-dichloro-1-butene ** 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						Frameshift type				
		WP2uvrA			TA98			TA1537				
S9mix (-)	0			25	25	17	22	19	27			
				(22 \pm 4.6)			(23 \pm 4.0)					
	39			22	22	29	ND					
				(24 \pm 4.0)								
	78			26	35	21	25	27	24			
				(27 \pm 7.1)			(25 \pm 1.5)					
	156			23	26	33	22	30	34			
				(27 \pm 5.1)			(29 \pm 6.1)					
	313			29	31	32	21	21	25			
			(31 \pm 1.5)			(22 \pm 2.3)						
625			21	32	31	27	24	23				
			(28 \pm 6.1)			(25 \pm 2.1)						
1250			25 *	34 *	24 *	19 *	28 *	24 *				
			(28 \pm 5.5)			(24 \pm 4.5)						
2500						0 *	0 *	0 *				
						(0 \pm 0.0)						
S9mix (+)	0			13	21	21	26	30	36	11	9	11
				(18 \pm 4.6)			(31 \pm 5.0)			(10 \pm 1.2)		
	39			25	24	24	33	29	27	6	10	10
				(24 \pm 0.6)			(30 \pm 3.1)			(9 \pm 2.3)		
	78			26	23	27	39	19	24	16	9	11
				(25 \pm 2.1)			(27 \pm 10.4)			(12 \pm 3.6)		
	156			25	32	12	25	25	31	15	7	11
				(23 \pm 10.1)			(27 \pm 3.5)			(11 \pm 4.0)		
	313			24	22	32	36	21	16	10	6	10
			(26 \pm 5.3)			(24 \pm 10.4)			(9 \pm 2.3)			
625			25	15	12	42	24	24	11	9	7	
			(17 \pm 6.8)			(30 \pm 10.4)			(9 \pm 2.0)			
1250			26 *	21 *	28 *	15 *	25 *	16 *	5 *	7 *	7 *	
			(25 \pm 3.6)			(19 \pm 5.5)			(6 \pm 1.2)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			AF2					
	Dose (μg /plate)			0.01			0.1					
	Number of colonies / plate			153	173	156	885	874	920			
			(161 \pm 10.8)			(893 \pm 24.0)						
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate			1380	1352	1338	415	380	348	283	262	239
			(1357 \pm 21.4)			(381 \pm 33.5)			(261 \pm 22.0)			

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 5. Results of confirmation test (II) in reverse mutation test of 3,4-dichloro-1-butene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mea ± S.D.)					
		Base - pair substitution type					
		TA100					
S9mix (-)	0	117	96	125			
		(113 ± 15.0)					
	250	196	174	201			
		(190 ± 14.4)					
	400	240	179	200			
		(206 ± 31.0)					
	550	202	174	211			
		(196 ± 19.3)					
S9mix (-)	700	205	217	221			
		(214 ± 8.3)					
	850	162	231	215			
	(203 ± 36.1)						
	1000	211 *	232 *	213 *			
		(219 ± 11.6)					
Positive control	Chemical	AF2					
	Dose (µg /plate)	0.01					
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	622	675	665			
		(654 ± 28.2)					

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide
 *: Inhibition was observed against growth of the bacteria.
 **: Purity was 99% and impurity was unknown.