



リン酸トリス(2-ブトキシエチル)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 .....	7
特 記 事 項 .....	8
文 献 .....	8
Tables 1～3	

## 【要 約】

リン酸トリス(2-ブトキシエチル) 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 無添加試験では、TA100 と TA1537 においては150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で、TA1535 と TA98 においては500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で、WP2 *uvrA* においては5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では、TA100、TA1535 および TA1537 においては500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で、TA98 と WP2 *uvrA* では1500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で抗菌性が認められた。したがって、本試験はS9 mix 無添加試験および添加試験ともに、最高用量を500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (S9 mix 無添加試験のTA100 と TA1537 は250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、S9 mix 添加試験のTA98 と WP2 *uvrA* は2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) として公比2で6用量を設定して実施した。

その結果、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倍以上となる再現性のあ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、リン酸トリス(2-ブトキシエチル) 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】

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、リン酸トリス(2-ブトキシエチル) 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インキュベーション法<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>、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<sup>3, 4)</sup>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。



〔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 および 2AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを $-20^{\circ}\text{C}$ 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-ヒスチン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	D-ビチン	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)製の最少寒天培地 (ロット番号: HY0302、1995年9月29日製造および HY0603、同年12月15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
リン酸水素二カルウム	10 g	バクアガー (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-338、1995年12月15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分間往復振とう培養したのち、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。各検定菌ごとの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。ただし、2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が10以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。



## 【結果および考察】

### 〔用量設定試験〕

T B E P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 無添加試験では、TA100 と TA1537 においては 150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で、TA1535 と TA98 においては 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で、WP2 *uvrA* においては 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では、TA100、TA1535 および TA1537 においては 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で、TA98 と WP2 *uvrA* では 1500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  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 無添加試験および添加試験とも 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (S9 mix 無添加試験の TA100 と TA1537 は 250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、S9 mix 添加試験の TA98 と WP2 *uvrA* は 2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) とした。

### 〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験とともに、上記の最高用量に基づいて公比2で6用量を設定して2回の本試験を実施した (Table 2、3)。その結果、いずれの検定菌においても、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。

T B E P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、リン酸トリス(2-ブトキシエチル) 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) 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.: *Mutat. Res.* 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
- 4) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984) pp.161-187

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of tris(2-butoxyethyl) phosphate on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean $\pm$ S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	93	108	116	7	11	8	18	28	34	20	26	28	12	8	15	
		( 106 $\pm$ 11.7 )			( 9 $\pm$ 2.1 )			( 27 $\pm$ 8.1 )			( 25 $\pm$ 4.2 )			( 12 $\pm$ 3.5 )			
	50.0	100			9			23			16			8			
	150	115 *			5			13			23			8 *			
	500	62 *			1 *			27			4 *			0 *			
	1500 c	66 *			2 *			21			10 *			0 *			
	5000 c	56 *			2 *			13 *			6 *			0 *			
S9mix (+)	0	128	96	130	11	13	16	25	28	21	17	35	32	9	7	11	
		( 118 $\pm$ 19.1 )			( 13 $\pm$ 2.5 )			( 25 $\pm$ 3.5 )			( 28 $\pm$ 9.6 )			( 9 $\pm$ 2.0 )			
	50.0	112			9			17			35			9			
	150	120			6			19			34			10			
	500	89 *			9 *			15			38			4 *			
	1500	126 *			9 *			22 *			20 *			0 *			
	5000	62 *			5 *			15 *			18 *			0 *			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	669	808	649	296	289	305	305	290	294	521	487	547	1607	1393	1388	
		( 709 $\pm$ 86.6 )			( 297 $\pm$ 8.0 )			( 296 $\pm$ 7.8 )			( 518 $\pm$ 30.1 )			( 1463 $\pm$ 125.0 )			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	895	546	664	368	301	276	676	690	656	488	261	338	356	363	330	
		( 702 $\pm$ 177.5 )			( 315 $\pm$ 47.6 )			( 674 $\pm$ 17.1 )			( 362 $\pm$ 115.4 )			( 350 $\pm$ 17.4 )			

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. c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 98.2 %.

Table 2-1. Results of reverse mutation test ( I ) of tris(2-butoxyethyl) phosphate on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean $\pm$ S.D.)											
		Base - pair substitution type						Frameshift type					
		TA100			TA1535			TA98			TA1537		
S9mix (-)	0	110	107	95	10	7	9	18	13	19	6	10	7
		( 104 $\pm$ 7.9 )			( 9 $\pm$ 1.5 )			( 17 $\pm$ 3.2 )			( 8 $\pm$ 2.1 )		
	7.81	122	134	106	ND			ND			5	8	7
		( 121 $\pm$ 14.0 )									( 7 $\pm$ 1.5 )		
	15.6	141	93	139	8	14	5	21	23	17	5	5	7
		( 124 $\pm$ 27.2 )			( 9 $\pm$ 4.6 )			( 20 $\pm$ 3.1 )			( 6 $\pm$ 1.2 )		
	31.3	117	116	117	17	11	14	15	26	23	7	3	6
		( 117 $\pm$ 0.6 )			( 14 $\pm$ 3.0 )			( 21 $\pm$ 5.7 )			( 5 $\pm$ 2.1 )		
S9mix (+)	62.5	128	122	108	8	8	15	15	17	14	8	9	7
		( 119 $\pm$ 10.3 )			( 10 $\pm$ 4.0 )			( 15 $\pm$ 1.5 )			( 8 $\pm$ 1.0 )		
	125	127	118	112	11	8	11	21	24	14	6	3	7
		( 119 $\pm$ 7.5 )			( 10 $\pm$ 1.7 )			( 20 $\pm$ 5.1 )			( 5 $\pm$ 2.1 )		
	250	89 *	73 *	94 *	1 *	6 *	6 *	18 *	17 *	20 *	0 *	0 *	0 *
		( 85 $\pm$ 11.0 )			( 4 $\pm$ 2.9 )			( 18 $\pm$ 1.5 )			( 0 $\pm$ 0.0 )		
	500				2 *	2 *	4 *	23 *	13 *	9 *			
					( 3 $\pm$ 1.2 )			( 15 $\pm$ 7.2 )					
S9mix (+)	0	145	121	138	9	7	18				11	9	10
		( 135 $\pm$ 12.3 )			( 11 $\pm$ 5.9 )						( 10 $\pm$ 1.0 )		
	15.6	163	140	148	11	17	15				13	6	15
		( 150 $\pm$ 11.7 )			( 14 $\pm$ 3.1 )						( 11 $\pm$ 4.7 )		
	31.3	142	150	172	11	15	7				9	13	12
		( 155 $\pm$ 15.5 )			( 11 $\pm$ 4.0 )						( 11 $\pm$ 2.1 )		
	62.5	180	121	172	10	9	8				12	12	16
		( 158 $\pm$ 32.0 )			( 9 $\pm$ 1.0 )						( 13 $\pm$ 2.3 )		
S9mix (+)	125	153	129	137	7	9	10				12	6	12
		( 140 $\pm$ 12.2 )			( 9 $\pm$ 1.5 )						( 10 $\pm$ 3.5 )		
	250	111	135	151	11	15	6				12	14	12
		( 132 $\pm$ 20.1 )			( 11 $\pm$ 4.5 )						( 13 $\pm$ 1.2 )		
	500	133 *	150 *	134 *	10 *	5 *	12 *				0 *	0 *	0 *
		( 139 $\pm$ 9.5 )			( 9 $\pm$ 3.6 )						( 0 $\pm$ 0.0 )		
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	0.01			0.5			0.1			80		
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	775	794	860	378	396	365	724	638	737	725	1204	1329
		( 810 $\pm$ 44.6 )			( 380 $\pm$ 15.6 )			( 700 $\pm$ 53.8 )			( 1086 $\pm$ 318.8 )		
Positive control	Chemical	2AA			2AA						2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2						2		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	632	740	739	301	300	326				315	338	356
		( 704 $\pm$ 62.1 )			( 309 $\pm$ 14.7 )						( 336 $\pm$ 20.6 )		

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 98.2 %.

ND: Not done

Table 2-2. Results of reverse mutation test ( I ) of tris(2-butoxyethyl) phosphate 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		
				WP2 <i>uvrA</i>	TA98		
S9mix (-)	0			15 20 18 ( 18 ± 2.5 )			
	156			24 19 27 ( 23 ± 4.0 )			
	313			16 24 23 ( 21 ± 4.4 )			
	625			18 22 21 ( 20 ± 2.1 )			
	1250			25 13 18 ( 19 ± 6.0 )			
	2500 c			20 18 25 ( 21 ± 3.6 )			
	5000 c			11 20 17 ( 16 ± 4.6 )			
S9mix (+)	0			31 14 23 ( 23 ± 8.5 )	26 26 19 ( 24 ± 4.0 )		
	78.1			21 20 20 ( 20 ± 0.6 )	21 31 25 ( 26 ± 5.0 )		
	156			15 22 22 ( 20 ± 4.0 )	30 28 16 ( 25 ± 7.6 )		
	313			20 19 28 ( 22 ± 4.9 )	25 25 25 ( 25 ± 0.0 )		
	625			17 25 18 ( 20 ± 4.4 )	12 29 25 ( 22 ± 8.9 )		
	1250			18 17 20 ( 18 ± 1.5 )	20 15 * 18 * ( 18 ± 2.5 )		
	2500			21 * 21 * 19 * ( 20 ± 1.2 )	18 * 25 * 13 * ( 19 ± 6.0 )		
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (µg /plate)			0.01			
	Number of colonies / plate			314 275 290 ( 293 ± 19.7 )			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA	2AA		
	Dose (µg /plate)			10	0.5		
	Number of colonies / plate			688 780 749 ( 739 ± 46.8 )	282 318 334 ( 311 ± 26.6 )		

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

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 98.2 %.

Table 3-1. Results of reverse mutation test ( II ) of tris(2-butoxyethyl) phosphate on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean $\pm$ S.D.)												
		Base - pair substitution type						Frameshift type						
		TA100			TA1535			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	117	108	101	11	10	14	19	21	14	11	16	13	
		( 109 $\pm$ 8.0 )			( 12 $\pm$ 2.1 )			( 18 $\pm$ 3.6 )			( 13 $\pm$ 2.5 )			
	7.81	112	107	107	ND			ND			6	7	2	
		( 109 $\pm$ 2.9 )									( 5 $\pm$ 2.6 )			
	15.6	107	83	93	9	8	7	25	20	21	8	4	11	
		( 94 $\pm$ 12.1 )			( 8 $\pm$ 1.0 )			( 22 $\pm$ 2.6 )			( 8 $\pm$ 3.5 )			
	31.3	104	104	94	9	5	11	19	23	18	9	6	10	
		( 101 $\pm$ 5.8 )			( 8 $\pm$ 3.1 )			( 20 $\pm$ 2.6 )			( 8 $\pm$ 2.1 )			
S9mix (-)	62.5	100	112	100	8	8	8	22	22	16	4	4	8	
		( 104 $\pm$ 6.9 )			( 8 $\pm$ 0.0 )			( 20 $\pm$ 3.5 )			( 5 $\pm$ 2.3 )			
	125	100	104	116	11	10	8	10	21	21	7	7	6*	
		( 107 $\pm$ 8.3 )			( 10 $\pm$ 1.5 )			( 17 $\pm$ 6.4 )			( 7 $\pm$ 0.6 )			
S9mix (-)	250	60*	73*	60*	5*	5*	5*	12*	15*	11	0*	0*	0*	
		( 64 $\pm$ 7.5 )			( 5 $\pm$ 0.0 )			( 13 $\pm$ 2.1 )			( 0 $\pm$ 0.0 )			
S9mix (-)	500				3*	2*	4*	12*	9*	10*				
					( 3 $\pm$ 1.0 )			( 10 $\pm$ 1.5 )						
S9mix (+)	0	112	106	107	12	6	8				22	8	6	
		( 108 $\pm$ 3.2 )			( 9 $\pm$ 3.1 )						( 12 $\pm$ 8.7 )			
	15.6	97	100	104	7	12	16				11	10	5	
		( 100 $\pm$ 3.5 )			( 12 $\pm$ 4.5 )						( 9 $\pm$ 3.2 )			
	31.3	114	100	88	11	10	10				13	8	14	
		( 101 $\pm$ 13.0 )			( 10 $\pm$ 0.6 )						( 12 $\pm$ 3.2 )			
	62.5	132	122	90	8	13	12				14	13	12	
		( 115 $\pm$ 21.9 )			( 11 $\pm$ 2.6 )						( 13 $\pm$ 1.0 )			
S9mix (+)	125	116	92	125	7	8	12				11	6	13	
		( 111 $\pm$ 17.1 )			( 9 $\pm$ 2.6 )						( 10 $\pm$ 3.6 )			
	250	92	90	108	9	13	11				11	9	9	
	( 97 $\pm$ 9.9 )			( 11 $\pm$ 2.0 )						( 10 $\pm$ 1.2 )				
S9mix (+)	500	80*	80*	91*	7*	7*	9*				0*	0*	0*	
		( 84 $\pm$ 6.4 )			( 8 $\pm$ 1.2 )						( 0 $\pm$ 0.0 )			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			9AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	0.01			0.5			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA						2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2						2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	512	607	650	274	271	345				227	292	311	
		( 590 $\pm$ 70.6 )			( 297 $\pm$ 41.9 )						( 277 $\pm$ 44.0 )			

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 98.2 %.

ND: Not done

Table 3-2. Results of reverse mutation test ( II ) of tris(2-butoxyethyl) phosphate 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		
				WP2 <i>uvrA</i>	TA98		
S9mix (-)	0			28 19 24 ( 24 ± 4.5 )			
	156			28 22 24 ( 25 ± 3.1 )			
	313			22 22 19 ( 21 ± 1.7 )			
	625			17 22 30 ( 23 ± 6.6 )			
	1250			20 17 15 ( 17 ± 2.5 )			
	2500 c			16 24 20 ( 20 ± 4.0 )			
	5000 c			16 20 20 ( 19 ± 2.3 )			
S9mix (+)	0			25 23 40 ( 29 ± 9.3 )	30 31 22 ( 28 ± 4.9 )		
	78.1			24 24 45 ( 31 ± 12.1 )	25 16 25 ( 22 ± 5.2 )		
	156			31 28 24 ( 28 ± 3.5 )	28 18 20 ( 22 ± 5.3 )		
	313			24 34 27 ( 28 ± 5.1 )	29 28 31 ( 29 ± 1.5 )		
	625			23 23 36 ( 27 ± 7.5 )	23 18 26 ( 22 ± 4.0 )		
	1250			24 30 24 ( 26 ± 3.5 )	24 * 17 * 19 * ( 20 ± 3.6 )		
	2500			19 * 22 * 20 * ( 20 ± 1.5 )	17 * 12 * 16 * ( 15 ± 2.6 )		
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (µg /plate)			0.01			
	Number of colonies / plate			303 312 331 ( 315 ± 14.3 )			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA	2AA		
	Dose (µg /plate)			10	0.5		
	Number of colonies / plate			485 499 470 ( 485 ± 14.5 )	308 348 287 ( 314 ± 31.0 )		

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

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 98.2 %.