ブチルメタクリレートの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：3174（ 115－062 ）

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目　　次

1.	要　　約	6 頁
2.	試　験　題　目	7
3.	試　験　目　的	7
4.	試　験　番　号	7
9.	被　験　物　質	8
10.	試験材料および方法	10
11.	試　験　結　果	16
12.	考察および結論	17
13.	参考とした資料	18

Figures および Tables

Figure 1	Bacterial reversion test of Butyl methacrylate in strain TA100	20
Figure 2	Bacterial reversion test of Butyl methacrylate in strain TA1535	21
Figure 3	Bacterial reversion test of Butyl methacrylate in strain WP2 *uvrA*	22
Figure 4	Bacterial reversion test of Butyl methacrylate in strain TA98	23
Figure 5	Bacterial reversion test of Butyl methacrylate in strain TA1537	24
Table 1	Results of the bacterial reversion test of Butyl methacrylate (1st trial) [direct method : -S9]	25
Table 2	Results of the bacterial reversion test of Butyl methacrylate (1st trial) [activation method : +S9]	26
Table 3	Results of the bacterial reversion test of Butyl methacrylate (2nd trial) [direct method : -S9]	27
Table 4	Results of the bacterial reversion test of Butyl methacrylate (2nd trial) [activation method : +S9]	28

1. 要　　約：

本試験条件下において，ブチルメタクリレートには遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した．

ブチルメタクリレートの変異原性について，遺伝子突然変異誘発性を検討するため，ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）TA100，TA98，TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌（*Escherichia coli*）WP2 *uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った．
その結果，ブチルメタクリレート処理では 9.77～1250μg／プレートのいずれの試験用量においても，ラット肝ミクロソーム（Ｓ９）添加の有無にかかわらず，溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった．
一方，直接法および代謝活性化法での陽性対照物質は，それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した．

2. 試　験　題　目：　ブチルメタクリレートの細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試　験　目　的：　被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討するため，環保業第237号，薬発第306号，62基局第303号（昭和62年３月31日）の「新規化学物質に係る試験の方法について」ならびにＯＥＣＤ化学品ガイドライン 471 および 472（1983年５月26日）に従って，細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した．
なお，試験の実施は環企研第233号，衛生第38号，63基局第823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第４条に規定する試験施設について」ならびにＯＥＣＤのＧＬＰ（1982年）の基準を満たすものとした．

4. 試　験　番　号：　３１７４（115－062）

9. 被験物質：

1) 被験物質名　　ブチルメタクリレート

2) CAS No.　　97－88－1

3) ロット番号

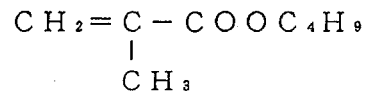
4) 純　　度　　99.6%

5) 提 供 元

6) 保管条件　　冷暗所

7) 化 学 名　　メタクリル酸n－ブチル

8) 化学構造



9) 分 子 式　　$C_8H_{14}O_2$

10) 分 子 量　　142

11) 物質の状態　　無色液体

12) 融　　点　　－60℃以下

13) 沸　　点　　164℃

14) 溶 解 性　　水：0.04 wt%／20℃

15) 安 定 性　　熱，光で重合する．室温，黄色灯下で安定．

16) 蒸 気 圧　　2626 Pa

17) 取り扱い上の注意	(1) 引火しやすく，またその蒸気は空気と混合して爆発性混合ガスを形成するので，火気は絶対に近づけなかった． (2) 静電気対策を行い，作業衣，作業靴は導電性のものを用いた． (3) 取り扱い後は，手洗い，洗顔を十分に行った．
18) 被験物質保管および残余被験物質の処理	保管用被験物質（1 g）以外の残余被験物質については，被験物質提供元に返却した．

10. 試験材料および方法：

1) 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから，試験菌株として次の５種類の菌株を選択した．

a. ネズミチフス菌　TA100　（ヒスチジン要求性の塩基対置換型）
b. ネズミチフス菌　TA98　（ヒスチジン要求性のフレームシフト型）
c. ネズミチフス菌　TA1535　（ヒスチジン要求性の塩基対置換型）
d. ネズミチフス菌　TA1537　（ヒスチジン要求性のフレームシフト型）
e. 大腸菌　WP2 *uvrA*　（トリプトファン要求性の塩基対置換型）

ネズミチフス菌は昭和58年９月９日に　から，また，大腸菌については昭和58年３月16日に　から分与を受けた．

平成９年２月12日に菌株の特性検査を実施し，本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した．

菌株の保存に当たっては，各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；MERCK 社；純度 99.7%以上，Lot No. K22063378 534）を容量比 80：７の割合で添加した後，凍結保存用チューブに 0.2 ml ずつ分注した．これを液体窒素を用いて凍結した後，超低温フリーザー（MDF-390AT；三洋電機特機株式会社）に保存（－80℃）した．

2) 培地の調製

a. 最少グルコース寒天平板培地（プレート）

オリエンタル酵母工業株式会社製のテスメディアＡＮ培地（Lot No. AN720IL，平成８年９月13日製造）を試験に使用した．本プレートは，Vogel-Bonner 最少培地Ｅを含む下記の組成の溶液 30 ml を無菌的にシャーレに分注したものである．

硫酸マグネシウム・７水塩	0.2	g
クエン酸・１水塩	2	g
リン酸二カリウム・無水塩	10	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
精製水	200	ml
グルコース	20	g
精製水	100	ml
寒天（No.1；UNIPATH 社；Lot No. 57225）	15	g
精製水	700	ml

b. トップアガー（軟寒天）

寒天（Bacto-agar：DIFCO 社；Lot No. 95925JD）0.6%を含む 0.5%塩化ナトリウム水溶液をオートクレーブで滅菌した後，ネズミチフス菌を用いる試験の場合，0.5 mM L-ヒスチジン（関東化学株式会社；Lot No. 412E1389）－0.5 mM D-ビオチン（関東化学株式会社，Lot No. 801S1718）水溶液を寒天溶液10容量に対し１容量加え，大腸菌を用いる試験の場合，0.5 mM L-トリプトファン（関東化学株式会社，Lot No. 608E1385）水溶液を同じく１容量加えた．

3）試験菌株の前培養

内容量 200 ml のバッフル付三角フラスコに 2.5%ニュートリエントブロス（UNIPATH 社；Lot No. 256 56843）溶液を 25 ml 分注し，これに凍結保存した菌懸濁液を融解した後，マイクロピペットを用いて 50μl 接種した．培養開始までの間冷却ユニット（ECS-1：東京理化器械株式会社）を用いて４℃に保存し，その後ウォーターバスシェーカー（MM-10：タイテック株式会社）を用い，37℃で６時間振盪（往復振盪：120回／分）培養した．培養終了後の菌懸濁液を使用時まで氷水中に保存した．

ＡＴＰフォトメーター（ルミテスター K-100：キッコーマン株式会社）を用いて計測した生菌数を以下に示した．

試　験	生　菌　数　（×10^9/ml）				
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
本試験（１回目）	4.77	4.66	4.69	4.60	2.26
本試験（２回目）	4.62	4.54	4.70	4.62	1.97

4) S 9 mix

キッコーマン株式会社製の S9 mix (Lot No. FSM-357) を試験に使用した．なお，製造後6ヵ月以内の S9 mix を使用した．S9 調製の際の動物種，性，臓器，誘導物質，誘導方法等ならびに S9 mix の組成を以下に示した．

a. ロット番号	RAA－357
b. 調製日	平成9年1月17日（誘導物質投与開始後5日目）
c. 使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系
d. 性／週齢	雄／7週齢
e. 体重	192～230 g
f. 臓器	肝臓
g. 誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
h. 投与量および投与回数	PB: 30 mg/kg 1回（1日目），60 mg/kg 3回（2～4日目） BF: 80 mg/kg 1回（3日目）
i. 投与方法	腹腔内投与
j. 蛋白含量	25.4 mg/ml

成分	S9 mix 1 ml 中の量
S 9	0.1 ml
$MgCl_2$	8 μmol
KCl	33 μmol
G－6－P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
Na－リン酸緩衝液（pH 7.4）	100 μmol

5) 被験物質溶液の調製

被験物質を DMSO (Lot No. K22063378 534) に溶解させ調製原液（12.5 mg/ml＝1250μg／プレートに相当）とした．この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に希釈した後，直ちに処理を行った．

6) 対照群

a. 溶媒対照

溶媒対照として，使用溶媒の DMSO のみで試験した．

b. 陽性対照

DMSO (Lot No. K22063378 534) を用いて陽性対照物質を溶解し，少量ずつ分注した後凍結保存（－20℃）した．これを融解した後，試験に用いた．

各菌株について，下記に示した用量で試験した．これらの試験用量は，労働省安全衛生部化学物質調査課編『安衛法における変異原性試験－試験ガイドラインとＧＬＰ』に準じて設定した．

《直接法》	菌　株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	AF-2	0.01 μg／プレート
〃	TA98	〃	0.1 〃
〃	TA1535	NaN_3	0.5 〃
〃	TA1537	ACR	80 〃
大　腸　菌	WP2 *uvrA*	AF-2	0.01 〃

《代謝活性化法》	菌　株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	2-AA	1 μg／プレート
〃	TA98	〃	0.5 〃
〃	TA1535	〃	2 〃
〃	TA1537	〃	2 〃
大　腸　菌	WP2 *uvrA*	〃	10 〃

AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド（和光純薬工業株式会社；純度 98.0～102.0%，Lot No. CAP0185）

NaN_3：アジ化ナトリウム（和光純薬工業株式会社；純度 99.0%以上，Lot No. TPR1596）

ACR ：9-アミノアクリジン塩酸塩（ALDRICH 社；純度 98.0%，Lot No. AQ08326HN）

2-AA：2-アミノアントラセン（和光純薬工業株式会社；純度 90.0%以上，Lot No. DLH6052）

c. 無菌試験

被験物質溶液（調製原液）ならびに S9 mix について無菌試験を実施した．すなわち，100μl の調製原液あるいは 100μl の S9 mix にトップアガー 2 ml を添加し，プレート上に注いだ．37℃の条件で48時間培養した後，雑菌汚染の有無を確認した．

調製原液および S9 mix のいずれについても２枚のプレートを用いて無菌試験を実施した．

7) 復帰突然変異試験

a. 試験用量

1枚のプレートを用いて実施した予備的な試験結果を以下に示す.

試験用量	S9	復帰突然変異コロニー数				
(μg/プレート)	mix	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
0	−	87	10	22	14	9
19.5	−	87	5	20	16	4
78.1	−	92	12	22	18	5
313	−	43*	6*	10*	4*	12*
1250	−	0*	11*	0*	0*	9*
0	+	95	10	20	28	14
19.5	+	80	11	14	28	9
78.1	+	116	8	25	27	13
313	+	67*	7	20	21*	17
1250	+	47*	9*	13*	0*	11*

*：試験菌株に対する生育阻害作用が観察された.

いずれの処理群においても復帰突然変異コロニー数の増加傾向は認められなかった. 本結果を基に, 本試験においては以下に示した用量を最高用量とし, それぞれ6～7用量（公比2）を設定した.

試験	最高用量 (μg/プレート)				
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
直接法	313	313	625	313	313
代謝活性化法	625	1250	1250	313	1250

b. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

キャップ付きチューブ（株式会社 アシスト）に, 使用溶媒, 被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を 100μl, 次いで直接法の場合, 0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.4）を 500μl, 代謝活性化法の場合, S9 mix を 500μl 分注した. さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100μl を加えた後, 振盪恒温器（M-100^{N}：タイテック株式会社）を用いて37℃で20分間振盪培養（プレインキュベーション）した. 培養終了後, トップアガーを 2 ml 添加し, 内容物を混合した. その後, 混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた. 重層したトップアガーが固化した後, 各プレートをビニルテープで密封し, 恒温器を用いて37℃の条件で48時間培養した.

1用量当たり3枚のプレートを用いた. また, 再現性を確認するため, 本試験を独立して2回実施した.

c. コロニー数計測

被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため，プレート上の試験菌株の生育状態について実体顕微鏡（×60）を用いて観察した．次いで，復帰突然変異により生じたコロニーを計数した．計測に際してはコロニーアナライザー（CA-11；システムサイエンス株式会社）を用い，面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した．

8）結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し，かつ，再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に，陽性と判定した．

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった．

11. 試　験　結　果：

1) 本試験（1回目）

試験結果を Figure 1～5 および Table 1～2 に示した.

ブチルメタクリレート処理による生育阻害作用は，直接法ならびに代謝活性化法とも高用量群において観察された．復帰突然変異により生じたコロニー数については，各被験物質処理群とも溶媒対照群の値と比較して明確な増加は認められなかった.

一方，陽性対照物質はそれぞれの菌株において，溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した.

なお，S9 mix 添加時，1250μg／プレートにおいて反応液が僅かに白濁したが，プレート表面には析出物は認められなかった.

2) 本試験（2回目）

試験結果を Figure 1～5 および Table 3～4 に示した.

被験物質処理群による生育阻害作用は各菌株の高用量群において観察された．復帰突然変異コロニー数については溶媒対照群と比較して増加傾向は認められなかった.

一方，陽性対照物質は各テスト菌株に対し，復帰突然変異を顕著に誘発した.

被験物質の析出状況は1回目の試験と同様であった.

ブチルメタクリレート調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において，菌の増殖は認められなかった.

以上，2回繰り返して実施した試験において，直接法および代謝活性化法の両試験とも再現性が確認された.

12. 考察および結論：

ブチルメタクリレートの変異原性，すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため，微生物（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した．
最高用量として試験菌株の生育が阻害される用量まで検討した．その結果，ブチルメタクリレート処理群では直接法および代謝活性化法のいずれにおいても，溶媒対照と比較し復帰突然変異コロニー数の増加傾向は認められなかった．
なお，溶媒対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数はいずれも当施設での背景データの範囲内であり，本試験は適切な条件でなされたと判断された．

以上の試験結果から，本試験条件下においてブチルメタクリレートの微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した．
なお，類縁化合物であるメタクリル酸 *tert*-ブチルエステル，メタクリル酸（2-ヒドロキシプロピル）エステルおよびメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルについては，*Salmonella typhimurium* TA100，TA98，TA1535，TA1537 および *Esherichia coli* WP2 *uvrA* を用いた復帰突然変異試験で陰性，CHL細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験で陽性と報告されている．

13. 参考とした資料：

・Ames, B. N., Lee, F.D. and Durston, W.E. : An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 782 ～ 786, 1973.

・Ames, B. N. et al, : Carcinogens are mutagens : A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 2,281 ～ 2,285, 1973.

・Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res., 31, 347 ～ 364, 1975.

・　　環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について，蛋白質・核酸・酵素，20 (13) , 16 ～ 27, 1975.

・労働省安全衛生部化学物質調査課編：　安衛法における変異原性試験ーテストガイドラインとＧＬＰー，中央労働災害防止協会，1991.

・石館　基　監修：　微生物を用いる変異原性試験データ集，エル・アイ・シー，1991.

・Maron, D. M. and Ames, B.N. : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 113, 173 ～ 215, 1983.

・　　化学物質毒性試験報告，4，499～506，1996.

・　　化学物質毒性試験報告，4，579～586，1996.

・　　化学物質毒性試験報告，5，543～552，1997.

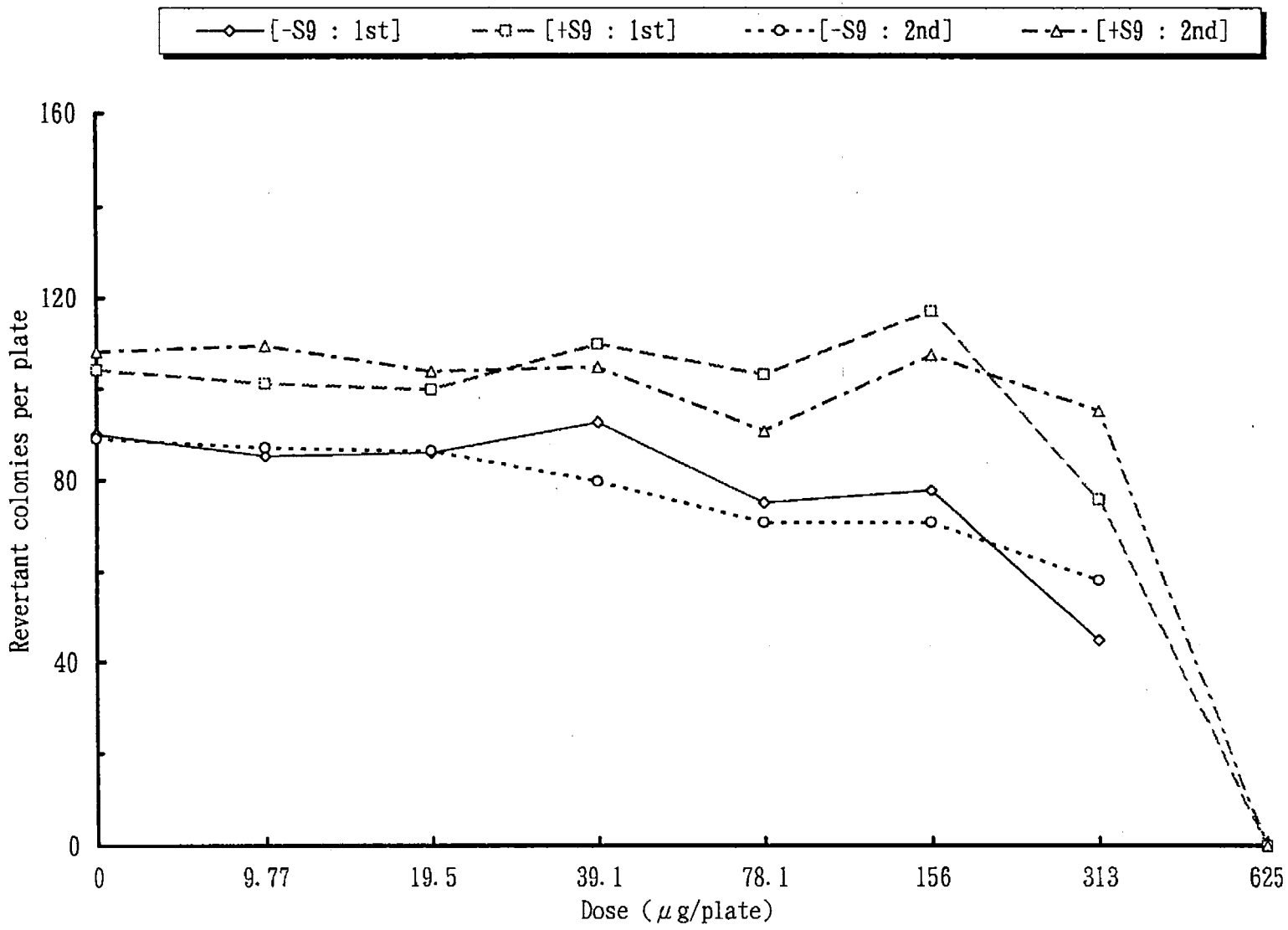


Figure 1. Bacterial reversion test of Butyl methacrylate in strain TA100

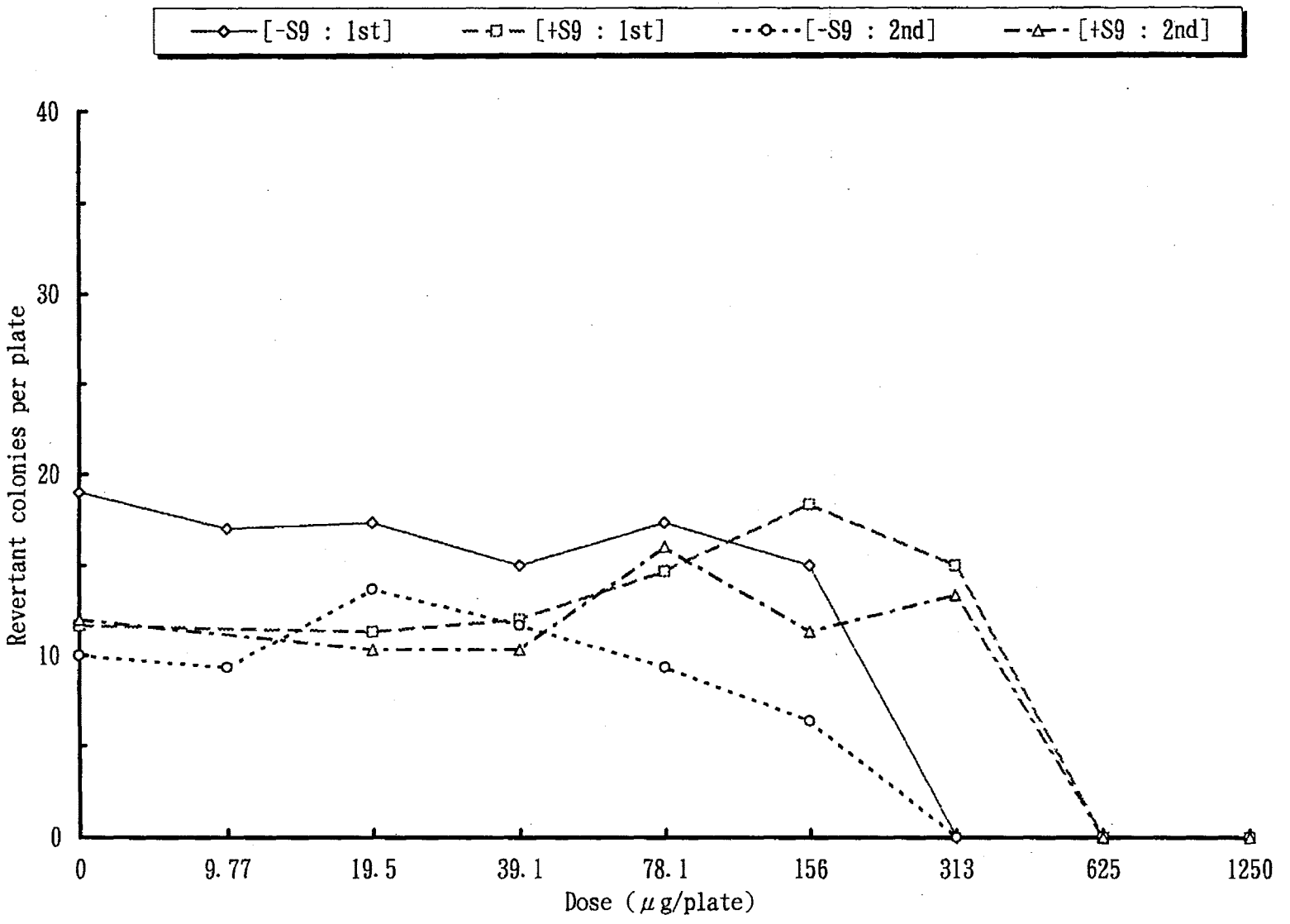


Figure 2. Bacterial reversion test of Butyl methacrylate in strain TA1535

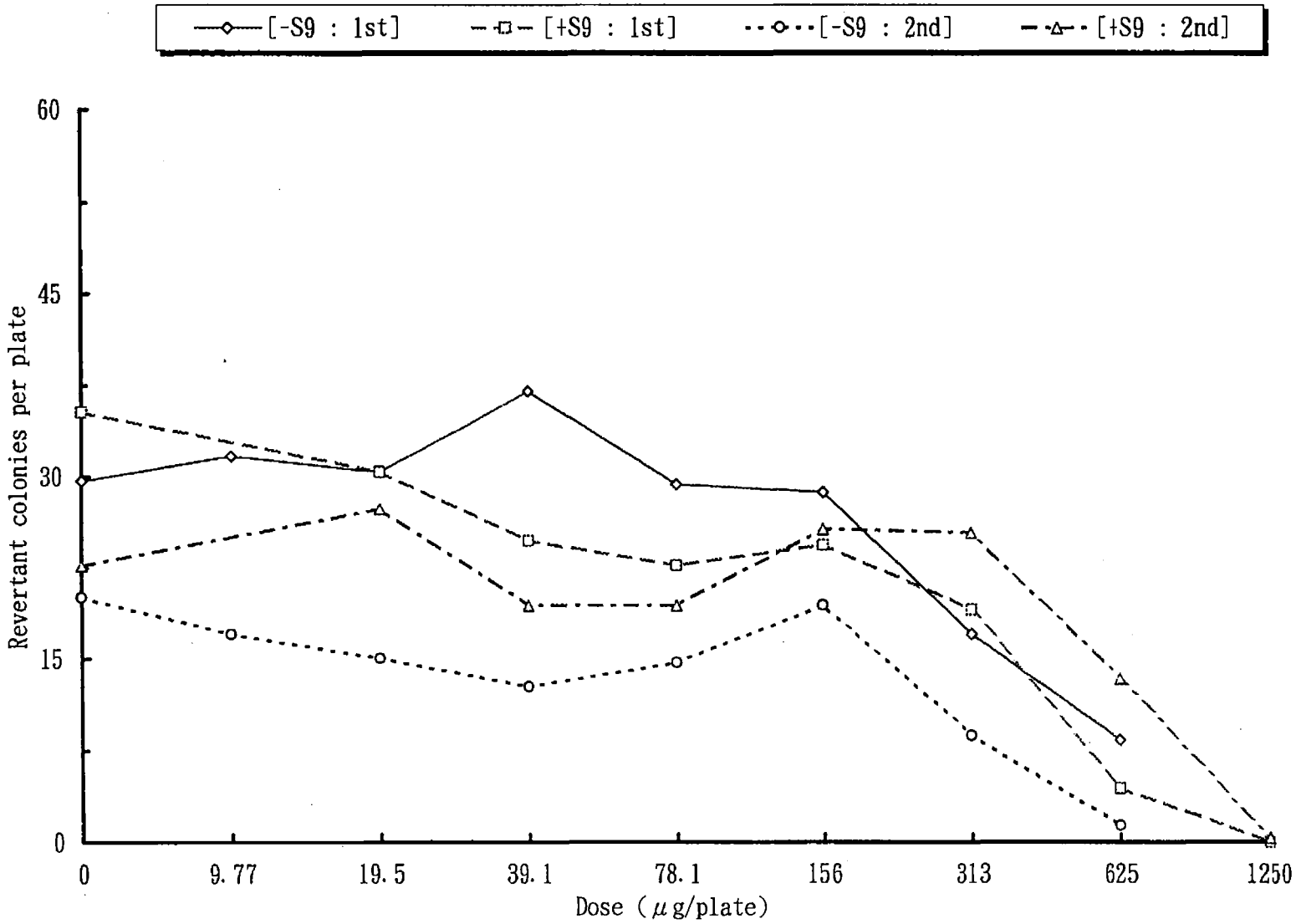


Figure 3. Bacterial reversion test of Butyl methacrylate in strain WP2*uvrA*

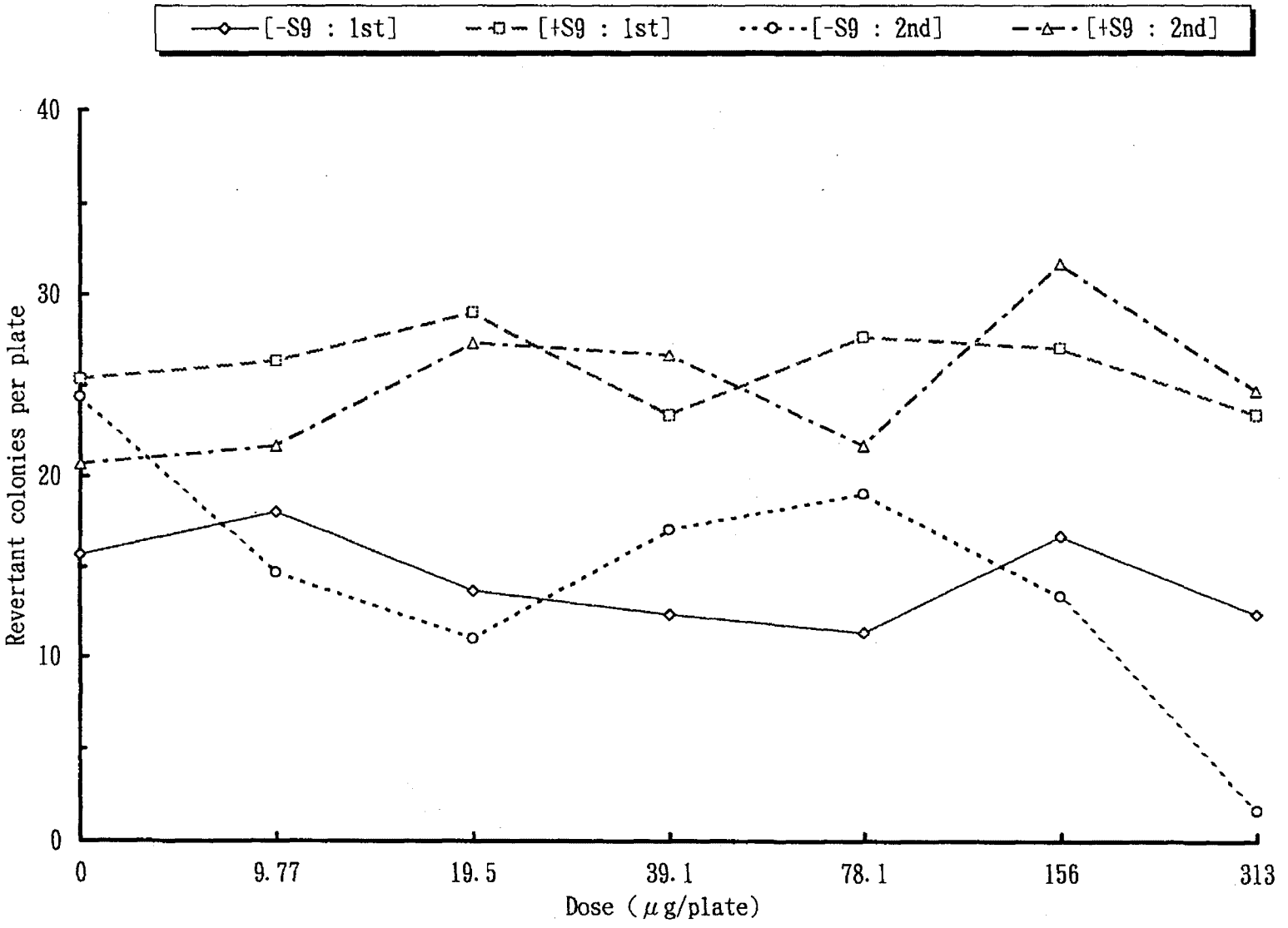


Figure 4. Bacterial reversion test of Butyl methacrylate in strain TA98

Exp. No. 3174 (115-062)

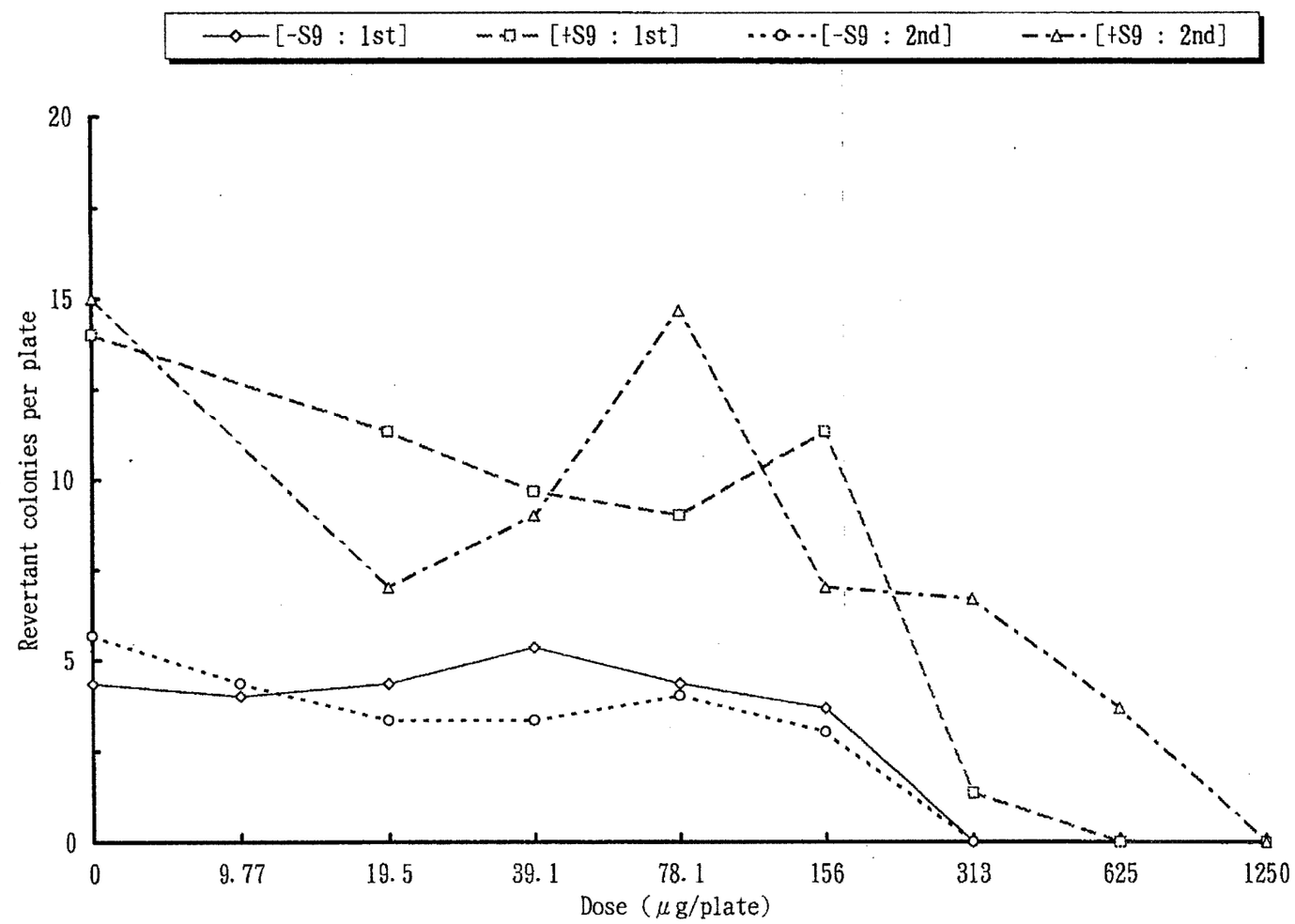


Figure 5. Bacterial reversion test of Butyl methacrylate in strain TA1537

Table 1. Results of the bacterial reversion test of Butyl methacrylate (1st trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.] TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	87 88 95 [90 ± 4]	21 18 18 [19 ± 2]	27 32 30 [30 ± 3]	13 15 19 [16 ± 3]	4 4 5 [4 ± 1]
Test substance	9.77	82 93 81 [85 ± 7]	22 13 16 [17 ± 5]	35 28 32 [32 ± 4]	16 17 21 [18 ± 3]	5 4 3 [4 ± 1]
	19.5	81 84 93 [86 ± 6]	14 19 19 [17 ± 3]	31 32 28 [30 ± 2]	14 15 12 [14 ± 2]	4 6 3 [4 ± 2]
	39.1	90 85 103 [93 ± 9]	13 18 14 [15 ± 3]	40 32 39 [37 ± 4]	15 9 13 [12 ± 3]	4 5 7 [5 ± 2]
	78.1	72 74 79 [75 ± 4]	20 17 15 [17 ± 3]	24 34 30 [29 ± 5]	8 10 16 [11 ± 4]	3 6 4 [4 ± 2]
	156	81* 76* 76* [78 ± 3]	13* 15* 17* [15 ± 2]	26* 31* 29* [29 ± 3]	14* 16* 20* [17 ± 3]	1* 7* 3* [4 ± 3]
	313	52* 44* 38* [45 ± 7]	0* 0* 0* [0 ± 0]	18* 18* 15* [17 ± 2]	6* 21* 10* [12 ± 8]	0* 0* 0* [0 ± 0]
	625	—	—	5* 13* 7* [8 ± 4]	—	—
Positive control		816 771 788[a)] [792 ± 23]	398 390 434[b)] [407 ± 23]	146 151 150[a)] [149 ± 3]	445 509 450[c)] [468 ± 36]	403 400 454[d)] [419 ± 30]

#: Solvent control *: Growth inhibition was observed —: Not tested
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5μg/plate
c): AF-2, 0.1μg/plate d): ACR; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80μg/plate

Table 2. Results of the bacterial reversion test of Butyl methacrylate (1st trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.] TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	99 116 97 [104 ± 10]	12 10 13 [12 ± 2]	37 31 38 [35 ± 4]	27 23 26 [25 ± 2]	16 11 15 [14 ± 3]
Test substance	9.77	98 96 109 [101 ± 7]	—	—	31 25 23 [26 ± 4]	—
	19.5	109 100 90 [100 ± 10]	13 10 11 [11 ± 2]	33 31 27 [30 ± 3]	23 31 33 [29 ± 5]	13 9 12 [11 ± 2]
	39.1	102 117 110 [110 ± 8]	9 13 14 [12 ± 3]	23 22 29 [25 ± 4]	24 22 24 [23 ± 1]	10 9 10 [10 ± 1]
	78.1	115 92 102 [103 ± 12]	13 14 17 [15 ± 2]	19 24 25 [23 ± 3]	30 29 24 [28 ± 3]	7 13 7 [9 ± 3]
	156	103 122 126 [117 ± 12]	20 19 16 [18 ± 2]	24 25 24 [24 ± 1]	27 26 28 [27 ± 1]	10 10 14 [11 ± 2]
	313	82* 73* 72* [76 ± 6]	14* 17* 14* [15 ± 2]	24 18 15 [19 ± 5]	22* 24* 24* [23 ± 1]	3* 1* 0* [1 ± 2]
	625	0* 0* 0* [0 ± 0]	0* 0* 0* [0 ± 0]	7* 5* 1* [4 ± 3]	—	0* 0* 0* [0 ± 0]
	1250	—	0* 0* 0* [0 ± 0]	0* 0* 0* [0 ± 0]	—	0* 0* 0* [0 ± 0]
Positive control		419 445 443[a)] [436 ± 14]	307 283 295[b)] [295 ± 12]	586 551 605[c)] [581 ± 27]	245 266 216[d)] [242 ± 25]	161 163 177[b)] [167 ± 9]

#: Solvent control *: Growth inhibition was observed —: Not tested
a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate

Table 3. Results of the bacterial reversion test of Butyl methacrylate (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.] TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	89 93 85 [89 ± 4]	11 9 10 [10 ± 1]	16 23 21 [20 ± 4]	20 27 26 [24 ± 4]	6 5 6 [6 ± 1]
Test substance	9.77	90 80 91 [87 ± 6]	6 11 11 [9 ± 3]	18 15 18 [17 ± 2]	11 16 17 [15 ± 3]	4 4 5 [4 ± 1]
	19.5	81 88 90 [86 ± 5]	12 13 16 [14 ± 2]	17 15 13 [15 ± 2]	11 12 10 [11 ± 1]	3 2 5 [3 ± 2]
	39.1	86 80 73 [80 ± 7]	13 9 13 [12 ± 2]	13 13 12 [13 ± 1]	16 15 20 [17 ± 3]	2 6 2 [3 ± 2]
	78.1	85 65 62 [71 ± 13]	11 6 11 [9 ± 3]	14 17 13 [15 ± 2]	20 20 17 [19 ± 2]	3 4 5 [4 ± 1]
	156	77* 70* 65* [71 ± 6]	8* 7* 4* [6 ± 2]	20* 18* 20* [19 ± 1]	17* 11* 12* [13 ± 3]	1* 2* 6* [3 ± 3]
	313	59* 55* 60* [58 ± 3]	0* 0* 0* [0 ± 0]	12* 6* 8* [9 ± 3]	4* 0* 1* [2 ± 2]	0* 0* 0* [0 ± 0]
	625	—	—	0* 0* 4* [1 ± 2]	—	—
Positive control		683 690 652[a)] [675 ± 20]	437 425 426[b)] [429 ± 7]	143 153 135[a)] [144 ± 9]	568 526 555[c)] [550 ± 22]	443 499 443[d)] [462 ± 32]

#: Solvent control *: Growth inhibition was observed —: Not tested
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5μg/plate
c): AF-2, 0.1μg/plate d): ACR; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80μg/plate

Table 4. Results of the bacterial reversion test of Butyl methacrylate (2nd trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.] TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	107 109 108 [108 ± 1]	13 12 11 [12 ± 1]	21 21 26 [23 ± 3]	23 20 19 [21 ± 2]	17 14 14 [15 ± 2]
Test substance	9.77	112 110 106 [109 ± 3]	—	—	16 26 23 [22 ± 5]	—
	19.5	99 97 115 [104 ± 10]	11 12 8 [10 ± 2]	27 32 23 [27 ± 5]	24 30 28 [27 ± 3]	7 6 8 [7 ± 1]
	39.1	97 115 102 [105 ± 9]	12 10 9 [10 ± 2]	23 20 15 [19 ± 4]	24 30 26 [27 ± 3]	12 6 9 [9 ± 3]
	78.1	94 89 89 [91 ± 3]	15 17 16 [16 ± 1]	16 21 21 [19 ± 3]	24 20 21 [22 ± 2]	16 13 15 [15 ± 2]
	156	102 114 106 [107 ± 6]	14 8 12 [11 ± 3]	28 22 27 [26 ± 3]	28 36 31 [32 ± 4]	8 9 4 [7 ± 3]
	313	98* 96* 91* [95 ± 4]	14* 16* 10* [13 ± 3]	21 31 24 [25 ± 5]	27* 22* 25* [25 ± 3]	7* 6* 7* [7 ± 1]
	625	0* 0* 0* [0 ± 0]	0* 0* 0* [0 ± 0]	12* 16* 12* [13 ± 2]	—	5* 3* 3* [4 ± 1]
	1250	—	0* 0* 0* [0 ± 0]	0* 0* 1* [0 ± 1]	—	0* 0* 0* [0 ± 0]
Positive control		422 394 423[a)] [413 ± 16]	299 255 264[b)] [273 ± 23]	496 521 515[c)] [511 ± 13]	210 217 231[d)] [219 ± 11]	153 166 162[b)] [160 ± 7]

#: Solvent control *: Growth inhibition was observed —: Not tested
a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate