

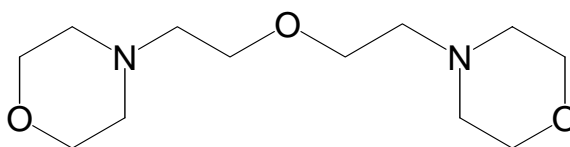
Bis(2-morpholinoethyl) ether

ビス (2 - モルホリノエチル) = エーテル

[CAS No. 6425-39-4]

Molecular formula: C₁₂H₁₄N₂ O₃

Molecular weight: 244.33



ABSTRACT

The test was conducted using *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537, and *Escherichia coli* (*E. coli*) WP2uvrA/pKM101, by the pre-incubation method with (+S9mix) or without (- S9mix) metabolic activation.

The dose-determination test was performed at eight doses of common ratio up to 5000 µg/plate. The test substance did not increase in number of revertant colonies more than twice that of the negative control (solvent control) in any tester strain with or without metabolic activation. No growth inhibition of the bacterial lawn with the chemical was observed at any concentration or strain tested.

The main test was performed with several doses up to the maximum recommended level of 5000 µg/plate. The test substance did not increase in number of revertant colonies more than twice that of the negative control in any strain with or without metabolic activation, and did not inhibit bacterial growth in any condition of the test.

The positive control substances assayed, increased the numbers of revertant colonies more than twice that of the solvent control. The numbers of revertant colonies for the negative and positive controls obtained in the present test were within the range of standard values derived from historical control data in our laboratory, which suggested that the tests were performed adequately.

Based on the above results, Bis(2-morpholinoethyl) ether was assessed to be non-mutagenic (negative) in the reverse mutation test in bacteria under the test condition.

Genetic Toxicity

Bacterial test

1. Material and method

Purity	: 94.8%
Test species/strain	: <i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537, <i>E. coli</i> WP2 <u>uvrA</u> /pKM101
Test method	: Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Chemical Substances Control Law of Japan) and OECD Test Guideline 471
Procedures	: Pre-incubation method
Solvent	: DMSO
Positive controls	: - S9 mix; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (TA100, WP2 <u>uvrA</u> /pKM101, TA98), sodium azide (TA1535) and 9-aminoacridine hydrochloride (TA1537) +S9 mix; 2-Aminoanthracene (all strains)
Dosage	: - S9 mix; 0, 2.29, 6.86, 20.6, 61.7, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate(all strains: Dose-determination test) 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (all strains: Main test) +S9 mix; 0, 2.29, 6.86, 20.6, 61.7, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate(all strains: Dose-determination test) 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (all strains: Main test)
S9	: Rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
Plates/test	: 3
Number of replicates	: 2
GLP	: Yes

2. Results

The chemical was assessed to be non-mutagenic (negative) in the reverse mutation test in bacteria under the test condition. Growth inhibition of the bacterial lawn with the chemical (toxicity) was not observed up to 5000 µg/plate in the five strains tested with or without metabolic activation.

Genetic effects:

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537,

	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]

Escherichia coli WP2uvrA/pKM101

	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]

ビス (2-モルホリノエチル) = エーテルの
細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Bis(2-morpholinoethyl)=ether in Bacteria

要約

試験は、ビス (2-モルホリノエチル) =エーテルの細菌に対する復帰突然変異原性の有無を検索することを目的とした。

試験菌株は、ネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101 の5菌株とし、試験方法としてプレインキュベーション法を用い、代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 及び直接法による場合 (-S9 mix) で試験を実施した。

用量設定試験を最高用量5000 μ g/プレートより公比3の8用量で実施したが、ネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535, TA1537及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101の代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 及び直接法による場合 (-S9 mix) のいずれにおいても、生育阻害 (抗菌作用) や陰性対照 (溶媒対照) 値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認められなかった。

本試験を最高用量5000 μ g/プレートより、公比2の5用量で実施したが、全菌株ともに代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 及び直接法による場合 (-S9 mix) のいずれにおいても、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認められなかった。

陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。

以上の結果より、ビス (2-モルホリノエチル) =エーテルは、使用した試験条件において、細菌に対する復帰突然変異原性を有しない (陰性) と判定した。

方法

1. 被験物質

1) 被験物質

被験物質のビス (2-モルホリノエチル) =エーテルは、XXXXXXXXXX 購入 (ロット番号: DLI3F) したもので、純度 94.8% の赤みの黄色透明液体である。被験物質は、入手後、使用時まで室温で暗所に保管した。被験物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを測定し、文献値と比較することにより確認した。また、被験物質の安定性は、使用開始前および使用終了後に赤外吸収スペクトルを測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

2) 被験物質溶液の調製

被験物質は、水に 100mg/ml [被験物質溶液量をプレート当たり 50 μ l にした場合に 5000 μ g の被験物質質量に相当する] 以上溶解し、また、被験物質に蒸留水を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られないことから蒸留水を溶媒に選択した。

被験物質の純度が 94.8% であったため、純度換算して被験物質溶液を調製した。

溶媒として選択した蒸留水 (高速液体クロマトグラフ用; 純度 99.9% 以上) は和光純薬工業㈱から購入 (ロット番号: KWP9781) し、使用時まで冷蔵庫に保管した。被験物質に蒸留水を加え攪拌して溶解した後、所定濃度に段階希釈し、直ちに試験に使用した。

2. 陽性対照物質

陽性対照物質は、下記の物質を使用した。

ナトリウム・アジド (NaN_3 ; 和光純薬工業㈱)

9-アミノアクリジン

(9-AA; Aldrich Chemical Co., Inc.)

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

(AF-2; 和光純薬工業㈱)

2-アミノアントラセン (2-AA; 和光純薬工業㈱)

ジメチルスルホキシド (DMSO) で調製した陽性対照物質溶液は、500 μ l ずつ凍結用チューブに分注し -80°C で保存した。試験のために解凍した陽性対照物質溶液の残りは再使用せず廃棄した。

3. 試験菌株

1) 試験菌株

従来から、細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されているほか、平成 15 年 11 月 21 日付薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環企発第 031121002 号、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」の「細菌を用いる復帰突然変異試験」及び OECD 化学品テストガイドライン 471 (微生物突然変異試験 1997 年 7 月 21 日採択) に規定されていることから、ネズミチフス菌¹⁾ TA100, TA1535, TA98, TA1537 及び大腸菌²⁾ WP2uvrA/pKM101 を試験に用いた。

東京大学医科学研究所癌生物学研究部より入手した菌株 (ネズミチフス菌: 1985 年 6 月 21 日入手, 大腸菌: 1983 年 6 月 29 日入手) をあらかじめ遺伝的性質 (特性) を調べて菌の性質が適切であることを確認し、菌懸濁液 0.8 ml に DMSO 0.07ml の割合で混合した菌液を 200 μ l ずつ凍結用チューブに分注し凍結した後、-80°C で保存し

復帰変異試験

た．前培養のために一度解凍した保存菌液は再使用せず廃棄した．

2) 試験菌株の前培養

三角フラスコを用い，15 ml の 2.5% ニュートリエントプロス培養液(ニュートリエントプロス No.2 , Oxoid 社)に解凍した保存菌液 30 μ l を接種し，37 $^{\circ}$ C で 10 時間旋回培養(回転数：120 回/分)し，静止期の初期で培養を止めた．分光光度計を用い，660nm で 1cm セルの吸光度を測定し，生菌数が 1×10^9 / ml 以上であることを確認し，試験に用いた．

4. S9 及び S9 mix

フェノバルビタール 及び 5,6-ベンゾフラボンを雄の SD ラットに腹腔内投与した肝臓をホモジナイズして，9000G で 10 分間遠心分離した上清³⁾を S9 として調製したものをキッコマン(株)より購入し，製造後 6 ヶ月以内のものを試験に使用した．

S9 mix は，1ml あたり下記の組成で試験ごとに調製した．

S9	0.1ml
MgCl ₂	8 μ mol
KCl	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADPH	4 μ mol
NADH	4 μ mol
Na-リン酸緩衝液	100 μ mol

5. 最小グルコース寒天平板培地等

1) トップアガー

寒天 0.6wt%，NaCl 0.5wt%の割合の水溶液を高圧蒸気滅菌し，室温で保存した．それを加温溶解し，ネズミチフス菌に用いるトップアガーの場合 L-ヒスチジンおよび D-ビオチンの最終濃度が 50 μ mol/l，また大腸菌に用いるトップアガーの場合 L-トリプトファンの最終濃度が 50 μ mol/l となるように滅菌したアミノ酸溶液を加え，各トップアガーを調製した．このトップアガーを約 45 $^{\circ}$ C に保温して試験に使用した．

2) 最小グルコース寒天平板培地

オリエンタル酵母工業(株)の最小グルコース寒天平板培地(テスメディア AN 培地)を購入し，製造後 6 ヶ月以内のものを試験に使用した．

6. 試験方法

一般的にプレインキュベーション法の方が感度良く被験物質の変異原性を検出できる^{4,5)}と考えられるため，プレインキュベーション法を用い，代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)で試験を実施した．

1) 試験方法

被験物質溶液又は溶媒 0.05ml 若しくは陽性対照物質

溶液 0.05 ml と S9 mix あるいは 0.1M Na-リン酸緩衝液 0.5 ml と試験菌の前培養液 0.1 ml を試験管に入れ，よく混合し 37 $^{\circ}$ C で 20 分間，恒温振とう水槽中で振とうした．プレインキュベーションした後，2 ml のトップアガーを加え，直ちに最小グルコース寒天平板培地(プレート)上に広げて固めた．固化したプレートを 37 $^{\circ}$ C で 48 時間，恒温培養器で上下を転倒して培養した．本被験物質の光への安定性は不明であったので，以上の操作は黄色灯下で実施した．

試験菌株の生育阻害(抗菌作用)状況を調べ復帰突然変異コロニー数を測定した．

2) 生育阻害(抗菌作用)の有無の確認方法

40 倍の実体顕微鏡を用い，すべてのプレートについて観察した．被験物質処理したプレートを陰性対照(溶媒対照)のプレートと比較し，アミノ酸要求性の微細なコロニー(バックグラウンドローン)の数が減少するか，減少して大きくなる場合に生育阻害(抗菌作用)があると判定した．

3) 無菌試験

試験に使用したものと同量の調製した S9 mix 溶液及び被験物質溶液(試験に用いた最高用量について実施)を最小グルコース寒天平板培地に軟寒天溶液で重層し，37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養して菌の生育の有無を目視で確認した．

7. 試験結果の解析方法(判定方法)

被験物質の用量の増加とともに復帰突然変異コロニー数が増加し，かつ陰性対照(溶媒対照)の 2 倍以上に増加し，再現性の得られた場合に陽性とする⁶⁾こととした．

上記の条件が満たされない場合は，陰性とする⁶⁾こととした．

データ解析のための統計学的手法は用いなかった．

報告書中のコロニー数は実数で表示し，平均値は小数点以下を四捨五入して表示した．

結果および考察

細菌を用いる復帰突然変異試験の結果

用量設定試験の結果を Table-1 に，本試験の結果を Table-2 に示した．

用量設定試験を最高用量 5000 μ g/プレートより公比 3 の 8 用量で実施したが，ネズミチフス菌 TA98 , TA100 , TA1535 , TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101 の代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)のいずれにおいても，生育阻害(抗菌作用)や陰性対照(溶媒対照)値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認められなかった．

本試験を最高用量 5000 μ g/プレートより，公比 2 の 5 用量で実施したが，全菌株ともに代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)のいずれにおいても，陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認

められなかった。

陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準⁷⁾の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。

以上の結果より、ビス(2-メルホリノエチル) = エーテルは、今回の試験条件において、細菌に対する復帰突然変異原性を有しない(陰性)と判定した。

文献

参考文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215
- 2) Green, M.H.L. and Muriel, W.J. 1976. Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 38: 3-32.
- 3) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. 1976. A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In "In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing", eds. F.J. de Serres, J.R. Fouts, J.R. Bend and R.M. Philpot, pp.85-88, Elsevier / North-Holland, Amsterdam.
- 4) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. 1980. Factors modulating mutagenicity in microbial tests. In "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens", eds. K.H. Norpoth and R.C. Garner, pp.273-285, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 5) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M. 1977. Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutat. Res.* 48: 121-130
- 6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* / mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364
- 7) 丹後俊郎著, 臨床検査への統計学, pp.74-80, 朝倉書店 (1986)

連絡先

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター
〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445
Tel 0463-82-3911 Fax 0463-82-3860

Correspondence

Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety and Health Association
2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257-0015, Japan
Tel +81-0463-82-3911 Fax +81-0463-82-3860

Table-1

Table of Results (Dose-Determination Test)

Test Substance : Bis(2-morpholinoethyl) ether

With (+) or Without (-) S9Mix	Test substance dose (µg/plate)	Number of revertants (Number of colonies/plate)											
		Base-pair substitution type						Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA/pKM101			TA98		
S9 mix (-)	0	111 (108 ± 10)	117 (108 ± 10)	97 (108 ± 10)	9 (9 ± 1)	9 (9 ± 1)	10 (9 ± 1)	67 (62 ± 9)	67 (62 ± 9)	52 (62 ± 9)	20 (23 ± 3)	25 (23 ± 3)	23 (23 ± 3)
	2.29	104 (114 ± 10)	123 (114 ± 10)	114 (114 ± 10)	7 (10 ± 5)	16 (10 ± 5)	7 (10 ± 5)	67 (73 ± 9)	83 (73 ± 9)	68 (73 ± 9)	17 (17 ± 1)	17 (17 ± 1)	16 (17 ± 1)
	6.86	129 (110 ± 18)	94 (110 ± 18)	107 (110 ± 18)	14 (10 ± 3)	9 (10 ± 3)	8 (10 ± 3)	63 (53 ± 8)	48 (53 ± 8)	49 (53 ± 8)	21 (22 ± 3)	25 (22 ± 3)	20 (22 ± 3)
	20.6	120 (120 ± 7)	114 (120 ± 7)	127 (120 ± 7)	9 (7 ± 2)	5 (7 ± 2)	7 (7 ± 2)	62 (61 ± 10)	71 (61 ± 10)	51 (61 ± 10)	22 (20 ± 5)	14 (20 ± 5)	23 (20 ± 5)
	61.7	109 (112 ± 10)	104 (112 ± 10)	124 (112 ± 10)	11 (8 ± 3)	8 (8 ± 3)	6 (8 ± 3)	63 (67 ± 8)	61 (67 ± 8)	76 (67 ± 8)	21 (18 ± 4)	20 (18 ± 4)	14 (18 ± 4)
	185	131 (124 ± 6)	120 (124 ± 6)	122 (124 ± 6)	16 (14 ± 3)	11 (14 ± 3)	14 (14 ± 3)	49 (51 ± 7)	61 (51 ± 7)	60 (51 ± 7)	20 (20 ± 5)	15 (20 ± 5)	24 (20 ± 5)
	556	107 (110 ± 11)	101 (110 ± 11)	122 (110 ± 11)	11 (11 ± 2)	13 (11 ± 2)	10 (11 ± 2)	66 (70 ± 5)	69 (70 ± 5)	76 (70 ± 5)	16 (16 ± 3)	18 (16 ± 3)	13 (16 ± 3)
	1667	131 (124 ± 8)	115 (124 ± 8)	127 (124 ± 8)	13 (14 ± 1)	14 (14 ± 1)	14 (14 ± 1)	51 (54 ± 6)	61 (54 ± 6)	51 (54 ± 6)	17 (21 ± 5)	26 (21 ± 5)	20 (21 ± 5)
	5000	121 (129 ± 8)	130 (129 ± 8)	137 (129 ± 8)	10 (9 ± 2)	6 (9 ± 2)	10 (9 ± 2)	67 (68 ± 7)	75 (68 ± 7)	62 (68 ± 7)	14 (16 ± 3)	15 (16 ± 3)	20 (16 ± 3)
	0	130 (124 ± 5)	120 (124 ± 5)	122 (124 ± 5)	10 (11 ± 2)	10 (11 ± 2)	13 (11 ± 2)	100 (97 ± 9)	87 (97 ± 9)	105 (97 ± 9)	25 (22 ± 4)	22 (22 ± 4)	18 (22 ± 4)
S9 mix (+)	2.29	120 (110 ± 12)	114 (110 ± 12)	97 (110 ± 12)	11 (9 ± 3)	9 (9 ± 3)	6 (9 ± 3)	106 (104 ± 3)	105 (104 ± 3)	100 (104 ± 3)	22 (23 ± 8)	15 (23 ± 8)	31 (23 ± 8)
	6.86	114 (104 ± 10)	104 (104 ± 10)	94 (104 ± 10)	10 (9 ± 2)	10 (9 ± 2)	7 (9 ± 2)	92 (103 ± 11)	114 (103 ± 11)	104 (103 ± 11)	15 (18 ± 4)	18 (18 ± 4)	22 (18 ± 4)
	20.6	120 (113 ± 7)	113 (113 ± 7)	107 (113 ± 7)	10 (8 ± 3)	9 (8 ± 3)	5 (8 ± 3)	85 (93 ± 12)	106 (93 ± 12)	87 (93 ± 12)	24 (22 ± 2)	21 (22 ± 2)	22 (22 ± 2)
	61.7	116 (115 ± 2)	113 (115 ± 2)	115 (115 ± 2)	10 (9 ± 1)	9 (9 ± 1)	8 (9 ± 1)	102 (96 ± 13)	106 (96 ± 13)	81 (96 ± 13)	24 (24 ± 1)	25 (24 ± 1)	24 (24 ± 1)
	185	131 (116 ± 13)	108 (116 ± 13)	108 (116 ± 13)	7 (7 ± 2)	8 (7 ± 2)	5 (7 ± 2)	105 (104 ± 10)	94 (104 ± 10)	113 (104 ± 10)	25 (26 ± 3)	29 (26 ± 3)	23 (26 ± 3)
	556	120 (114 ± 7)	106 (114 ± 7)	115 (114 ± 7)	9 (7 ± 2)	6 (7 ± 2)	7 (7 ± 2)	99 (95 ± 4)	92 (95 ± 4)	94 (95 ± 4)	24 (26 ± 3)	29 (26 ± 3)	25 (26 ± 3)
	1667	123 (119 ± 10)	108 (119 ± 10)	127 (119 ± 10)	10 (11 ± 2)	11 (11 ± 2)	13 (11 ± 2)	97 (101 ± 7)	98 (101 ± 7)	109 (101 ± 7)	28 (24 ± 4)	24 (24 ± 4)	21 (24 ± 4)
	5000	144 (143 ± 1)	142 (143 ± 1)	142 (143 ± 1)	8 (9 ± 2)	8 (9 ± 2)	11 (9 ± 2)	101 (100 ± 2)	97 (100 ± 2)	101 (100 ± 2)	15 (19 ± 4)	20 (19 ± 4)	23 (19 ± 4)
Positive control without S9Mix	Name	A F - 2			NaN ₃			A F - 2			A F - 2		
	Dose(µg/plate)	0 . 0 1			0 . 5			0 . 0 0 5			0 . 1		
	No. of colonies per plate	557 (562 ± 11)	555 (562 ± 11)	575 (562 ± 11)	300 (323 ± 21)	328 (323 ± 21)	341 (323 ± 21)	1292 (1265 ± 93)	1162 (1265 ± 93)	1341 (1265 ± 93)	555 (575 ± 18)	579 (575 ± 18)	591 (575 ± 18)
Positive control with S9Mix	Name	2 - A A			2 - A A			2 - A A			2 - A A		
	Dose(µg/plate)	1			2			2			0 . 5		
	No. of colonies per plate	1235 (1250 ± 25)	1278 (1250 ± 25)	1236 (1250 ± 25)	260 (278 ± 19)	276 (278 ± 19)	298 (278 ± 19)	904 (905 ± 2)	903 (905 ± 2)	907 (905 ± 2)	411 (406 ± 14)	416 (406 ± 14)	390 (406 ± 14)

[Note]

- Test substance was dissolved in water.
- The number shown in parentheses indicated the average ± standard deviation in each doses.
- Name of positive control substances abbreviated as ; AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro -2-furyl)acryl-amide,
NaN₃ : Sodium azide, 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene.

Table-2

Table of Results (Main Test)

Test Substance : Bis(2-morpholinoethyl) ether

With (+) or Without (-) S9Mix	Test substance dose (μ g/plate)	Number of revertants (Number of colonies/plate)														
		Base-pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA/pKM101			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	117	115	119	11	9	9	75	70	71	16	24	23	8	8	13
		(117 \pm 2)			(10 \pm 1)			(72 \pm 3)			(21 \pm 4)			(10 \pm 3)		
	313	104	121	111	9	8	10	81	90	90	17	16	18	5	9	6
		(112 \pm 9)			(9 \pm 1)			(87 \pm 5)			(17 \pm 1)			(7 \pm 2)		
	625	111	120	107	14	8	6	72	83	94	17	24	18	9	8	13
		(113 \pm 7)			(9 \pm 4)			(83 \pm 11)			(20 \pm 4)			(10 \pm 3)		
S9 mix (+)	1250	134	136	129	6	8	6	69	64	90	25	18	23	7	9	7
		(133 \pm 4)			(7 \pm 1)			(74 \pm 14)			(22 \pm 4)			(8 \pm 1)		
	2500	107	111	134	10	11	6	71	78	82	21	18	28	7	6	9
		(117 \pm 15)			(9 \pm 3)			(77 \pm 6)			(22 \pm 5)			(7 \pm 2)		
	5000	142	129	108	10	8	6	67	72	70	18	16	23	10	7	8
		(126 \pm 17)			(8 \pm 2)			(70 \pm 3)			(19 \pm 4)			(8 \pm 2)		
S9 mix (+)	0	114	101	113	15	11	9	107	111	91	17	28	22	11	10	11
		(109 \pm 7)			(12 \pm 3)			(103 \pm 11)			(22 \pm 6)			(11 \pm 1)		
	313	108	120	112	5	13	11	91	89	106	25	22	22	9	9	7
		(113 \pm 6)			(10 \pm 4)			(95 \pm 9)			(23 \pm 2)			(8 \pm 1)		
	625	113	116	122	10	13	8	106	115	107	17	32	18	11	13	9
		(117 \pm 5)			(10 \pm 3)			(109 \pm 5)			(22 \pm 8)			(11 \pm 2)		
Positive control without S9Mix	1250	155	136	142	10	13	9	123	107	100	24	26	31	10	13	13
		(144 \pm 10)			(11 \pm 2)			(110 \pm 12)			(27 \pm 4)			(12 \pm 2)		
	2500	124	131	149	15	7	14	113	109	108	23	34	29	11	11	10
		(135 \pm 13)			(12 \pm 4)			(110 \pm 3)			(29 \pm 6)			(11 \pm 1)		
	5000	133	142	129	10	13	13	121	99	102	32	24	22	10	9	10
		(135 \pm 7)			(12 \pm 2)			(107 \pm 12)			(26 \pm 5)			(10 \pm 1)		
Positive control with S9Mix	Name	A F - 2			NaN ₃			A F - 2			A F - 2			9 - A A		
	Dose(μ g/plate)	0 . 0 1			0 . 5			0 . 0 0 5			0 . 1			8 0		
	No. of colonies per plate	699	657	679	295	342	318	1168	1019	1182	454	483	472	433	429	419
Positive control with S9Mix	Name	2 - A A			2 - A A			2 - A A			2 - A A			2 - A A		
	Dose(μ g/plate)	1			2			2			0 . 5			2		
	No. of colonies per plate	1236	1354	1278	274	260	269	828	825	748	417	429	397	192	200	174
Positive control with S9Mix		(1289 \pm 60)			(268 \pm 7)			(800 \pm 45)			(414 \pm 16)			(189 \pm 13)		

[Note]

- Test substance was dissolved in water.
- The number shown in parentheses indicated the average \pm standard deviation in each doses.
- Name of positive control substances abbreviated as ; AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro -2-furyl)acryl-amide,
NaN₃ : Sodium azide, 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene.