



1-メトキシナフタレン 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 .....	8
Tables 1～3	

## 【要 約】

1-メトキシナフタレ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、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 添加および無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  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で行ったところ、S9 mix 無添加試験ではTA100, TA1535 および TA1537 は150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、TA98 は500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、WP2 *uvrA* は5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、S9 mix 添加試験ではTA1537 は150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、TA100, TA1535 および TA98 は500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、WP2 *uvrA* は1500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で抗菌性が認められた。また、TA98 のS9 mix 添加試験では本試験Iで最高用量の500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  でも抗菌性が認められなかったため、用量を上げて本試験Iをやり直した。したがって、本試験ではS9 mix 無添加試験をTA100, TA1535 および TA1537 は7.81~250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 は15.6~500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は156~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で、S9 mix 添加試験をTA1537 は7.81~250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA100 および TA1535 は15.6~500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 は31.3~1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は78.1~2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で用量を設定して実施した。

その結果、2回の本試験とも、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、1-メトキシナフタレンは、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。

## 【結 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、1-メトキシナフタレンについて、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<sup>(1)</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>(2)</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。

## 【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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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 pKM 101 (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、 $37^{\circ}\text{C}$ 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〕

1-メトキシナフタレン (MN、CAS No. 2216-69-5) は、分子量 158.20 の微黄色透明液体である。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 98% (不純物：不明) であり、から購入した。被験物質は、使用時まで室温保管した。

MNは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号：KCL2807、和光純薬工業(株)) に 50 mg/ml になるように溶解した後、同溶媒で公比約 3 ないし 2 で希釈し、速やかに試験に用いた。

MNの DMSO 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、本試験Ⅱで調製した低濃度 (0.0781 mg/ml) 溶液および高濃度 (50.0 mg/ml) 溶液について、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、98.9および 99.7%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量が初期値の90%以上）であった（Appendix 2）。

また、本試験Ⅱ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 3）。

〔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℃ 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。

2) 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）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)

<sup>**</sup> 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) 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、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 およびトッパアガー 2 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。



## 【結果および考察】

### 〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。MN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 TA100, TA1535 および TA1537 は 150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、TA98 は 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、WP2 *uvrA* は 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では TA1537 は 150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、TA100, TA1535 および TA98 は 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、WP2 *uvrA* は 1500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量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 無添加試験では 250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA98 は 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )、S9 mix 添加試験では 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA1537 は 250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は 2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) とした。

### 〔本試験〕

TA98 の S9 mix 添加試験では、本試験 I で最高用量の 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  でも抗菌性が認められなかったため、最高用量を 1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  に上げて本試験 I をやり直した。2 回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。MNの用量を、S9 mix 無添加試験では TA100, TA1535 および TA1537 は 7.81～250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 は 15.6～500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は 156～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で、S9 mix 添加試験では TA1537 は 7.81～250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA100 および TA1535 は 15.6～500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 は 31.3～1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は 78.1～2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で公比を 2 として設定し試験を実施した。その結果、2 回の試験のいずれも、用いた 5 種類の検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験において、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。

MN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、1-メトキシナフタレンは、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) 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 1-methoxynaphthalene \*\* 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						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	92	88	83	14	10	13	31	25	24	17	20	27	8	3	8	
		( 88 ± 4.5 )			( 12 ± 2.1 )			( 27 ± 3.8 )			( 21 ± 5.1 )			( 6 ± 2.9 )			
	50	89			15			23			26			8			
	150	102 *			10 *			24			30			7 *			
	500	83 *			3 *			32			17 *			6 *			
	1500	43 *			0 *			23			13 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			6 *			0 *			0 *			
S9 mix (+)	0	85	85	110	16	15	16	23	23	23	26	34	31	8	7	7	
		( 93 ± 14.4 )			( 16 ± 0.6 )			( 23 ± 0.0 )			( 30 ± 4.0 )			( 7 ± 0.6 )			
	50	135			12			38			34			16			
	150	115			14			26			35			15 *			
	500	99 *			2 *			26			21 *			10 *			
	1500	0 *			0 *			10 *			7 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			8 *			0 *			0 *			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	451	557	477	308	292	250	146	123	118	686	670	745	835	1053	1077	
		( 495 ± 55.2 )			( 283 ± 30.0 )			( 129 ± 14.9 )			( 700 ± 39.5 )			( 988 ± 133.3 )			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1144	1310	1219	333	240	272	1467	1476	1419	512	480	517	244	228	208	
		( 1224 ± 83.1 )			( 282 ± 47.2 )			( 1454 ± 30.6 )			( 503 ± 20.1 )			( 227 ± 18.0 )			

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%.

Table 2-1. Results of reverse mutation test ( I ) of 1-methoxynaphthalene \*\*  
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	137	132	121	11	19	24	28	35	36	13	9	8
		( 130 $\pm$ 8.2 )			( 18 $\pm$ 6.6 )			( 33 $\pm$ 4.4 )			( 10 $\pm$ 2.6 )		
	7.81	133	115	109	14	17	14	ND			7	10	13
		( 119 $\pm$ 12.5 )			( 15 $\pm$ 1.7 )						( 10 $\pm$ 3.0 )		
	15.6	125	127	136	15	20	15	30	36	41	11	8	10
		( 129 $\pm$ 5.9 )			( 17 $\pm$ 2.9 )			( 36 $\pm$ 5.5 )			( 10 $\pm$ 1.5 )		
	31.3	83	123	136	14	19	20	29	31	31	3	12	8
		( 114 $\pm$ 27.6 )			( 18 $\pm$ 3.2 )			( 30 $\pm$ 1.2 )			( 8 $\pm$ 4.5 )		
	62.5	115	115	124	13	19	20	30	35	30	13	11	14
	( 118 $\pm$ 5.2 )			( 17 $\pm$ 3.8 )			( 32 $\pm$ 2.9 )			( 13 $\pm$ 1.5 )			
125	112	103	94	9	17	15	24	22	27	7	16	9	
	( 103 $\pm$ 9.0 )			( 14 $\pm$ 4.2 )			( 24 $\pm$ 2.5 )			( 11 $\pm$ 4.7 )			
250	107 *	103 *	99 *	14 *	18 *	14 *	32	19	35	8 *	9 *	7 *	
	( 103 $\pm$ 4.0 )			( 15 $\pm$ 2.3 )			( 29 $\pm$ 8.5 )			( 8 $\pm$ 1.0 )			
500							29 *	21 *	29 *				
							( 26 $\pm$ 4.6 )						
S9mix (+)	0	111	134	144	11	19	13	43	35	33	11	7	17
		( 130 $\pm$ 16.9 )			( 14 $\pm$ 4.2 )			( 37 $\pm$ 5.3 )			( 12 $\pm$ 5.0 )		
	7.81				ND			ND			14	13	13
											( 13 $\pm$ 0.6 )		
	15.6	163	136	178	16	21	14	ND			20	8	13
		( 159 $\pm$ 21.3 )			( 17 $\pm$ 3.6 )						( 14 $\pm$ 6.0 )		
	31.3	170	162	178	27	21	13	31	39	40	11	9	15
		( 170 $\pm$ 8.0 )			( 20 $\pm$ 7.0 )			( 37 $\pm$ 4.9 )			( 12 $\pm$ 3.1 )		
	62.5	175	153	133	14	19	21	31	38	43	18	10	10
	( 154 $\pm$ 21.0 )			( 18 $\pm$ 3.6 )			( 37 $\pm$ 6.0 )			( 13 $\pm$ 4.6 )			
125	130	117	141	15	24	13	33	33	34	12	15	16	
	( 129 $\pm$ 12.0 )			( 17 $\pm$ 5.9 )			( 33 $\pm$ 0.6 )			( 14 $\pm$ 2.1 )			
250	141	133	132	13	9	16	30	39	42	20 *	17 *	16 *	
	( 135 $\pm$ 4.9 )			( 13 $\pm$ 3.5 )			( 37 $\pm$ 6.2 )			( 18 $\pm$ 2.1 )			
500	93 *	138 *	111 *	7 *	7 *	7 *	38	39	30				
	( 114 $\pm$ 22.6 )			( 7 $\pm$ 0.0 )			( 36 $\pm$ 4.9 )						
1000							33 *	27 *	35 *				
							( 32 $\pm$ 4.2 )						
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			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2			0.5			2		
	Number of colonies / plate	1234	1347	1501	278	249	236	259	263	258	184	264	259
		( 1361 $\pm$ 134.0 )			( 254 $\pm$ 21.5 )			( 260 $\pm$ 2.6 )			( 236 $\pm$ 44.8 )		

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%.

ND : Not done

Table 2-2. Results of reverse mutation test ( I ) of 1-methoxynaphthalene \*\* 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					
				WP2uvrA			
S9mix (-)	0			21 23 26 ( 23 ± 2.5 )			
	156			24 28 22 ( 25 ± 3.1 )			
	313			19 26 22 ( 22 ± 3.5 )			
	625			25 19 20 ( 21 ± 3.2 )			
	1250			16 13 13 ( 14 ± 1.7 )			
	2500			12 12 11 ( 12 ± 0.6 )			
	5000			10 12 9 ( 10 ± 1.5 )			
S9mix (+)	0			30 18 23 ( 24 ± 6.0 )			
	78.1			18 38 31 ( 29 ± 10.1 )			
	156			25 29 30 ( 28 ± 2.6 )			
	313			29 33 20 ( 27 ± 6.7 )			
	625			22 18 21 ( 20 ± 2.1 )			
	1250			21 16 19 ( 19 ± 2.5 )			
	2500			13 * 8 * 11 * ( 11 ± 2.5 )			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (µg /plate)			0.01			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose (µg /plate)			10			
	Number of colonies / plate			108 121 101 ( 110 ± 10.1 )			
	Number of colonies / plate			1166 1335 1277 ( 1259 ± 85.9 )			

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

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

\*\*: Purity was 98%.

Table 3-1. Results of reverse mutation test ( II ) of 1-methoxynaphthalene \*\*  
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	127	135	160	13	14	8	27	13	30	9	16	10	( 141 $\pm$ 17.2 )	( 12 $\pm$ 3.2 )	( 23 $\pm$ 9.1 )	( 12 $\pm$ 3.8 )
	7.81	112	116	121	14	19	9	ND			11	13	10	( 116 $\pm$ 4.5 )	( 14 $\pm$ 5.0 )		( 11 $\pm$ 1.5 )
	15.6	100	118	98	12	10	8	29	22	32	12	5	10	( 105 $\pm$ 11.0 )	( 10 $\pm$ 2.0 )	( 28 $\pm$ 5.1 )	( 9 $\pm$ 3.6 )
	31.3	96	127	106	21	6	14	26	34	36	11	11	14	( 110 $\pm$ 15.8 )	( 14 $\pm$ 7.5 )	( 32 $\pm$ 5.3 )	( 12 $\pm$ 1.7 )
	62.5	129	106	107	10	17	7	16	18	22	10	9	12	( 114 $\pm$ 13.0 )	( 11 $\pm$ 5.1 )	( 19 $\pm$ 3.1 )	( 10 $\pm$ 1.5 )
	125	89 *	111 *	82 *	11	8	9	9	22	19	10 *	5 *	4 *	( 94 $\pm$ 15.1 )	( 9 $\pm$ 1.5 )	( 17 $\pm$ 6.8 )	( 6 $\pm$ 3.2 )
	250	89 *	92 *	91 *	8 *	10 *	5 *	16 *	19 *	23 *	8 *	2 *	8 *	( 91 $\pm$ 1.5 )	( 8 $\pm$ 2.5 )	( 19 $\pm$ 3.5 )	( 6 $\pm$ 3.5 )
	500							18 *	13 *	26 *						( 19 $\pm$ 6.6 )	
S9mix (+)	0	131	150	134	16	11	13	31	29	31	13	13	13	( 138 $\pm$ 10.2 )	( 13 $\pm$ 2.5 )	( 30 $\pm$ 1.2 )	( 13 $\pm$ 0.0 )
	7.81				ND			ND			19	17	13				( 16 $\pm$ 3.1 )
	15.6	144	155	156	12	19	10	ND			7	13	7	( 152 $\pm$ 6.7 )	( 14 $\pm$ 4.7 )		( 9 $\pm$ 3.5 )
	31.3	151	151	147	18	16	20	36	37	39	10	12	11	( 150 $\pm$ 2.3 )	( 18 $\pm$ 2.0 )	( 37 $\pm$ 1.5 )	( 11 $\pm$ 1.0 )
	62.5	146	161	160	12	18	13	37	35	34	19	8	11	( 156 $\pm$ 8.4 )	( 14 $\pm$ 3.2 )	( 35 $\pm$ 1.5 )	( 13 $\pm$ 5.7 )
	125	148	135	145	17	12	19	28	42	31	12	17	20	( 143 $\pm$ 6.8 )	( 16 $\pm$ 3.6 )	( 34 $\pm$ 7.4 )	( 16 $\pm$ 4.0 )
	250	130	113	113	6 *	11 *	11 *	40	29	24	13 *	14 *	11 *	( 119 $\pm$ 9.8 )	( 9 $\pm$ 2.9 )	( 31 $\pm$ 8.2 )	( 13 $\pm$ 1.5 )
	500	74 *	78 *	72 *	6 *	6 *	2 *	27 *	19 *	15 *				( 75 $\pm$ 3.1 )	( 5 $\pm$ 2.3 )	( 20 $\pm$ 6.1 )	
	1000							0 *	0 *	0 *						( 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			2AA						
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2			0.5			2						
	Number of colonies / plate	665	691	678	294	315	320	878	865	935	1270	1518	1580	( 678 $\pm$ 13.0 )	( 310 $\pm$ 13.8 )	( 893 $\pm$ 37.2 )	( 1456 $\pm$ 164.0 )
	Number of colonies / plate	916	943	1176	265	268	313	270	324	303	241	265	253	( 1012 $\pm$ 143.0 )	( 282 $\pm$ 26.9 )	( 299 $\pm$ 27.2 )	( 253 $\pm$ 12.0 )

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%.

ND : Not done

Table 3-2. Results of reverse mutation test ( II ) of 1-methoxynaphthalene \*\* 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					
				WP2uvrA			
S9mix (-)	0			20	24	17	
				( 20 ± 3.5 )			
	156			33	32	22	
				( 29 ± 6.1 )			
	313			32	21	20	
				( 24 ± 6.7 )			
	625			18	19	25	
				( 21 ± 3.8 )			
S9mix (+)	1250			22	17	26	
				( 22 ± 4.5 )			
	2500			15	25	15	
				( 18 ± 5.8 )			
	5000			10	5	6	
				( 7 ± 2.6 )			
S9mix (+)	0			32	33	30	
				( 32 ± 1.5 )			
	78.1			24	30	19	
				( 24 ± 5.5 )			
	156			26	26	22	
				( 25 ± 2.3 )			
	313			22	28	18	
				( 23 ± 5.0 )			
S9mix (+)	625			15	21	28	
				( 21 ± 6.5 )			
	1250			10	17	19	
				( 15 ± 4.7 )			
	2500			6 *	12 *	11 *	
				( 10 ± 3.2 )			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (µg /plate)			0.01			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose (µg /plate)			10			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate			1485	1628	1694	
				( 1602 ± 106.8 )			

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

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

\*\*: Purity was 98%.