



アセナフテン  
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 .....	3
材料および方法 .....	4
結果および考察 .....	8
結 論 .....	9
特 記 事 項 .....	9
文 献 .....	10
Tables 1～8	

## 【要 約】

アセナフ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、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、2回の本試験および2回の再現性試験を行った。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、TA1537 においてすべての用量で、TA100、TA1535 および TA98 において、150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で、S9 mix 添加試験では TA1537 において 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で抗菌性が認められた。したがって、本試験は S9 mix 無添加試験では 200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA1537 は 50.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )、S9 mix 添加試験では 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA1537 は 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) として公比2で5～7用量を設定して行った。その結果、TA1537 の S9 mix 添加試験およびその他の検定菌においては、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。TA1537 の S9 mix 無添加試験では、本試験 I の 12.5 および 25.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で変異コロニー数が溶媒対照値の2倍となったため、本試験と同一の用量で再現性試験 I を行った。その結果、すべての用量で溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたが、変異コロニー数の偶発的な増加の可能性が考えられたため、25.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  を最高用量として公差 5.00  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で5用量を設定して再現性試験 II を行ったが、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。

TA1537 の S9 mix 無添加試験では、明確な結論が得られなかったため、国立衛生試験所の能美健彦博士から分与を受けた TA1537 および TA1537 と検出する変異原物質が類似している TA97 を用いて追加試験を行った。まず、5.00～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で用量設定試験を行ったところ、いずれの検定菌においても 50.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で抗菌性が認められたため、1.56～50.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で用量を設定して2回の本試験を行った。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。これらのことから、TA1537 および TA97 の S9 mix 無添加試験においては変異原性が認められないものと考えられる。

以上の結果から、アセナフテンは、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。

## 【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、アセナフテンについて、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、サルモネラ菌（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。

## 【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。

ただし、TA1537 の S9 mix 無添加試験では、明確な結論が得られなかったため、1996  
年 9 月 25 日に から分与を受けた TA1537 (以下 TA1537E と  
記載) および TA1537 と検出する変異原物質が類似している *S. typhimurium* の TA97 を  
用いて追加試験を行った。

検定菌は $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存したものをを用い、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) の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

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~12時間10分往復振とう培養したものを検定菌液  
とした。

### 〔被 験 物 質〕

アセナフテン (略称: AN、CAS No. 83-32-9) は、分子量 154.21 の淡黄色結晶である。  
構造式等は Appendix に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99.9%  
以上 (不純物: 不明) であり、 から供与された。被験物質は、使  
用時まで密封、防湿して冷蔵した。

ANは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: ESK4546 および DLF7632、和光純  
薬工業(株)) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、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。ただし、再現性試験Ⅱにおいては、 $5.00\text{ mg/ml}$  の調製液

を等差になるように希釈して、調製を行った。

〔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-アミノアクリン (Sigma Chem. Co. ロット番号 96F05641 および 106F06681, 純度98%以上)  
2AA : 2-アミノノラセチン (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-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	D-ビオチン	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、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、HY0603、同年12月15日製造および HY2101、1997年3月7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。

\*\* : HY2101 では、大洋寒天 (清水食品) を使用。

3) S9 mix (1 ml中下記の成分を含む)

S9***	0.1 ml	NADH	4 $\mu$ mol
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol	NADPH	4 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol		

\*\*\* : 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日製造および RAA-359、1997年2月21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に用いた。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、再現性試験および追加試験においては、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、結果の再現性の確認を行った。また、TA1537 の S9 mix 無添加試験については、変異コロニー数増加の再現性と用量依存性を確認するために、再現性試験 I および再現性試験 II 行った。更に、追加試験として、TA1537E と TA97 の S9 mix 無添加試験について、1回の用量設定試験と2回の本試験を実施した。



〔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。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こととした。

## 【結果および考察】

### 〔用量設定試験〕

A N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、TA1537 においてすべての用量で、TA100、TA1535 および TA98 において、150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で、S9 mix 添加試験では TA1537 において 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  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 無添加試験では 200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA1537 は 50.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA* は 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )、S9 mix 添加試験では 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA1537 は 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) 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 5～7 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、TA1537 の S9 mix 添加試験と、その他の検定菌においては、2 回の本試験とも溶媒対照値の 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。一方、TA1537 の S9 mix 無添加試験においては、本試験 I の 12.5 および 25.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で、溶媒対照値の 2 倍となる変異コロニー数を示したが、本試験 II では溶媒対照値の 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。

### 〔再現性試験〕

TA1537 の S9 mix 無添加試験では、本試験 I と本試験 II の結果が異なるため、本試験と同一の用量で再現性試験 I を実施した (Table 4)。その結果、すべての用量で溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた。しかし、本試験と再現性試験 I で、ともに溶媒対照値は 10 以下と低く、被験物質を処理した群で認められた変異コロニー数は、いずれも 1995 年 10 月から 1996 年 2 月の溶媒対照値の蓄積データの範囲内 (サンプル数: 77、平均値  $\pm$  標準偏差:  $11 \pm 15$ ) であり、用量依存性も認められなかったことから、変異コロニー数が偶発的に溶媒対照値の 2 倍を超えた可能性が考えられた。そこで、25.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  を最高用量として、公差 5.00  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で 5 用量を設定して、再現性試

験Ⅱを実施した（Table 5）。その結果、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ず、用量依存性もみられなかった。

#### 〔追加試験〕

TA1537 の S9 mix 無添加試験については、明確な結論が得られなかったため、TA1537E および TA97 を用いて S9 mix 無添加の条件で追加試験を実施した。まず、5.00～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で公比を約3として、用量設定試験を行った結果、いずれの検定菌においても 50.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  において抗菌性が認められた（Table 6）。この結果に基づいて、1.56～50.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で公比を2として2回の本試験を実施した（Table 7、8）。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。これらの結果から、当該被験物質は S9 mix 無添加の条件で、TA1537 および TA97 に対して変異原性を示さないものと考えられる。

AN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、アセナフテンは、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。ただし、TA1537 の S9 mix 無添加試験については、本試験の結果に再現性試験および追加試験の結果を併せて総合的に判定した。

【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 acenaphthene 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537								
S9mix (-)	0	85	104	112	9	6	7	10	24	14	19	15	19	9	5	7	( 100 ± 13.9 )	( 7 ± 1.5 )	( 16 ± 7.2 )	( 18 ± 2.3 )	( 7 ± 2.0 )	
	50.0	76			6			18			18			8 *								
	150	81 *			6 *			13			9 *			0 *								
	500	69 *			4 *			14			12 *			0 *								
	1500 c	12 *			2 *			21			10 *			0 *								
	5000 c	4 *			3 *			15			10 *			0 *								
S9mix (+)	0	104	117	115	9	13	21	24	33	31	27	27	34	14	14	17	( 112 ± 7.0 )	( 14 ± 6.1 )	( 29 ± 4.7 )	( 29 ± 4.0 )	( 15 ± 1.7 )	
	50.0	143			11			23			31			11								
	150	126			9			24			33			9								
	500	91			8			26			22			11 *								
	1500 c	19			0			18			28			0 *								
	5000 c	30			0			17			10			0 *								
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	600	705	796	303	298	337	616	613	594	324	305	312	333	294	315	( 700 ± 98.1 )	( 313 ± 21.2 )	( 608 ± 11.9 )	( 314 ± 9.6 )	( 314 ± 19.5 )	

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 above 99.9%.

Table 2-1. Results of reverse mutation test ( I ) of acenaphthene 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	130	121	124	6	9	11				28	16	23	10	7	9	
		( 125 $\pm$ 4.6 )			( 9 $\pm$ 2.5 )						( 22 $\pm$ 6.0 )			( 9 $\pm$ 1.5 )			
	0.781	ND			ND						ND			10 18 11			
														( 13 $\pm$ 4.4 )			
	1.56	ND			ND						ND			19 9 9			
														( 12 $\pm$ 5.8 )			
	3.13	ND			ND						ND			17 19 12			
														( 16 $\pm$ 3.6 )			
	6.25	111	111	127	2	8	9				22	21	21	8	8	7	
	( 116 $\pm$ 9.2 )			( 6 $\pm$ 3.8 )						( 21 $\pm$ 0.6 )			( 8 $\pm$ 0.6 )				
12.5	126	131	134	8	8	8				21	27	20	15	19	21		
	( 130 $\pm$ 4.0 )			( 8 $\pm$ 0.0 )						( 23 $\pm$ 3.8 )			( 18 $\pm$ 3.1 )				
25.0	167	123	113	14	7	11				26	22	30	17	19	19		
	( 134 $\pm$ 28.7 )			( 11 $\pm$ 3.5 )						( 26 $\pm$ 4.0 )			( 18 $\pm$ 1.2 )				
50.0	139	119	101	6	8	8				20	20	20	7 *	5 *	8 *		
	( 120 $\pm$ 19.0 )			( 7 $\pm$ 1.2 )						( 20 $\pm$ 0.0 )			( 7 $\pm$ 1.5 )				
100	107	91	111	5 *	7 *	3 *				18 *	10 *	11 *					
	( 103 $\pm$ 10.6 )			( 5 $\pm$ 2.0 )						( 13 $\pm$ 4.4 )							
200	91 *	89 *	107 *	5 *	11 *	5 *				10 *	18 *	14 *					
	( 96 $\pm$ 9.9 )			( 7 $\pm$ 3.5 )						( 14 $\pm$ 4.0 )							
S9mix (+)	0	121	130	134	12	9	17	27	23	35	28	25	32				
		( 128 $\pm$ 6.7 )			( 13 $\pm$ 4.0 )			( 28 $\pm$ 6.1 )			( 28 $\pm$ 3.5 )						
	313	156	134	148	10	7	8	27	31	30	32	19	38				
		( 146 $\pm$ 11.1 )			( 8 $\pm$ 1.5 )			( 29 $\pm$ 2.1 )			( 30 $\pm$ 9.7 )						
	625	154	166	140	8	13	8	32	35	35	24	34	30				
		( 153 $\pm$ 13.0 )			( 10 $\pm$ 2.9 )			( 34 $\pm$ 1.7 )			( 29 $\pm$ 5.0 )						
	1250 c	110	122	123	6	9	5	17	30	29	40	29	37				
	( 118 $\pm$ 7.2 )			( 7 $\pm$ 2.1 )			( 25 $\pm$ 7.2 )			( 35 $\pm$ 5.7 )							
2500 c	82	81	69	7	8	6	22	10	20	31	34	36					
	( 77 $\pm$ 7.2 )			( 7 $\pm$ 1.0 )			( 17 $\pm$ 6.4 )			( 34 $\pm$ 2.5 )							
5000 c	59	61	33	9	6	5	27	29	30	30	24	25					
	( 51 $\pm$ 15.6 )			( 7 $\pm$ 2.1 )			( 29 $\pm$ 1.5 )			( 26 $\pm$ 3.2 )							
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	697	690	730	313	321	333				629	620	602	691	786	623	
		( 706 $\pm$ 21.4 )			( 322 $\pm$ 10.1 )						( 617 $\pm$ 13.7 )			( 700 $\pm$ 81.9 )			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA						
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2			10			0.5						
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	871	800	846	327	277	315	592	609	599	289	330	372				
		( 839 $\pm$ 36.0 )			( 306 $\pm$ 26.1 )			( 600 $\pm$ 8.5 )			( 330 $\pm$ 41.5 )						

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 above 99.9%.

ND : Not done

Table 2-2. Results of reverse mutation test ( I ) of acenaphthene 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>		TA1537	
S9mix (-)	0			24 16 33 ( 24 ± 8.5 )			
	313			14 26 13 ( 18 ± 7.2 )			
	625			28 16 17 ( 20 ± 6.7 )			
	1250 c			18 22 31 ( 24 ± 6.7 )			
	2500 c			14 28 21 ( 21 ± 7.0 )			
	5000 c			37 27 12 ( 25 ± 12.6 )			
S9mix (+)	0					11 17 18 ( 15 ± 3.8 )	
	15.6					26 28 19 ( 24 ± 4.7 )	
	31.3					25 27 30 ( 27 ± 2.5 )	
	62.5					31 29 23 ( 28 ± 4.2 )	
	125					26 29 19 ( 25 ± 5.1 )	
	250					8 13 12 ( 11 ± 2.6 )	
	500					21 15 * 18 * ( 18 ± 3.0 )	
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (µg /plate)			0.01			
	Number of colonies / plate			226 274 270 ( 257 ± 26.6 )			
Positive control S9 mix (+)	Chemical					2AA	
	Dose (µg /plate)					2	
	Number of colonies / plate					260 311 302 ( 291 ± 27.2 )	

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 above 99.9%.

Table 3-1. Results of reverse mutation test ( II ) of acenaphthene 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	119	120	112	11	13	7				23	28	21	13	12	15	
		( 117 ± 4.4 )			( 10 ± 3.1 )						( 24 ± 3.6 )			( 13 ± 1.5 )			
	1.56	ND			ND						ND			11 23 17			
														( 17 ± 6.0 )			
	3.13	ND			ND						ND			17 18 19			
														( 18 ± 1.0 )			
	6.25	139	134	119	12	12	10				29	22	32	15	14	12	
		( 131 ± 10.4 )			( 11 ± 1.2 )						( 28 ± 5.1 )			( 14 ± 1.5 )			
	12.5	118	139	119	13	12	12				28	23	19	19	11	15	
	( 125 ± 11.8 )			( 12 ± 0.6 )						( 23 ± 4.5 )			( 15 ± 4.0 )				
25.0	124	125	123	9	14	10				18	24	25	20	13	12		
	( 124 ± 1.0 )			( 11 ± 2.6 )						( 22 ± 3.8 )			( 15 ± 4.4 )				
50.0	108	89	133	5	8	8				26	18	26	19 *	15 *	9		
	( 110 ± 22.1 )			( 7 ± 1.7 )						( 23 ± 4.6 )			( 14 ± 5.0 )				
100	92 *	89 *	89 *	2 *	1 *	2 *				28	17	20					
	( 90 ± 1.7 )			( 2 ± 0.6 )						( 22 ± 5.7 )							
200	106 *	97 *	92 *	7 *	4 *	9 *				15 *	7 *	10 *					
	( 98 ± 7.1 )			( 7 ± 2.5 )						( 11 ± 4.0 )							
S9mix (+)	0	130	101	148	12	6	10	18	28	26	32	33	33				
		( 126 ± 23.7 )			( 9 ± 3.1 )			( 24 ± 5.3 )			( 33 ± 0.6 )						
	313	126	143	126	12	11	4	25	29	31	29	27	37				
		( 132 ± 9.8 )			( 9 ± 4.4 )			( 28 ± 3.1 )			( 31 ± 5.3 )						
	625	129	104	112	8	9	8	24	40	18	20	30	29				
		( 115 ± 12.8 )			( 8 ± 0.6 )			( 27 ± 11.4 )			( 26 ± 5.5 )						
	1250 c	84	84	82	7	4	4	31	20	30	29	29	38				
	( 83 ± 1.2 )			( 5 ± 1.7 )			( 27 ± 6.1 )			( 32 ± 5.2 )							
2500 c	63	72	82	5	2	8	18	29	17	34	36	30					
	( 72 ± 9.5 )			( 5 ± 3.0 )			( 21 ± 6.7 )			( 33 ± 3.1 )							
5000 c	59	80	60	6	5	10	22	20	16	31	30	21					
	( 66 ± 11.8 )			( 7 ± 2.6 )			( 19 ± 3.1 )			( 27 ± 5.5 )							
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA						AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5						0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA						
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5						
	Number of colonies / plate	470	736	677	286	284	287				378	420	329	673	1380	1318	
		( 628 ± 139.7 )			( 286 ± 1.5 )						( 376 ± 45.5 )			( 1124 ± 391.5 )			
	Number of colonies / plate	624	753	841	322	276	278	677	668	661	287	271	289				
		( 739 ± 109.1 )			( 292 ± 26.0 )			( 669 ± 8.0 )			( 282 ± 9.9 )						

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 above 99.9%.

ND : Not done



Table 3-2. Results of reverse mutation test ( II ) of acenaphthene 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		
				WP2 <i>uvrA</i>		TA1537	
S9mix (-)	0			25 24 20 ( 23 $\pm$ 2.6 )			
	313			31 21 19 ( 24 $\pm$ 6.4 )			
	625			23 23 18 ( 21 $\pm$ 2.9 )			
	1250 c			31 11 14 ( 19 $\pm$ 10.8 )			
	2500 c			18 13 14 ( 15 $\pm$ 2.6 )			
	5000 c			10 23 16 ( 16 $\pm$ 6.5 )			
S9mix (+)	0					15 18 15 ( 16 $\pm$ 1.7 )	
	15.6					14 10 9 ( 11 $\pm$ 2.6 )	
	31.3					16 16 17 ( 16 $\pm$ 0.6 )	
	62.5					17 13 12 ( 14 $\pm$ 2.6 )	
	125					15 13 11 ( 13 $\pm$ 2.0 )	
	250					12 20 * 18 * ( 17 $\pm$ 4.2 )	
	500					11 * 6 * 12 * ( 10 $\pm$ 3.2 )	
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)			0.01			
	Number of colonies / plate			291 295 240 ( 275 $\pm$ 30.7 )			
Positive control S9 mix (+)	Chemical					2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)					2	
	Number of colonies / plate					241 223 268 ( 244 $\pm$ 22.6 )	

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 above 99.9%.

Table 4. Results of confirmation test ( I ) in reverse mutation test of acenaphthene 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.)						
					Frameshift type			
					TA1537			
S9mix  (-)	0				8	2	7	( 6 $\pm$ 3.2 )
	1.56				20	14	22	( 19 $\pm$ 4.2 )
	3.13				20	25	20	( 22 $\pm$ 2.9 )
	6.25				30	26	22	( 26 $\pm$ 4.0 )
	12.5				4	17	14	( 12 $\pm$ 6.8 )
	25.0				21	21	27	( 23 $\pm$ 3.5 )
	50.0				9 *	19 *	10 *	( 13 $\pm$ 5.5 )
Positive control S9 mix (-)	Chemical				9AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)				80			
	Number of colonies / plate				558	1059	1013	( 877 $\pm$ 276.9 )

9AA: 9-Aminoacridine

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

Purity was above 99.9%.

Table 5. Results of confirmation test ( II ) in reverse mutation test of acenaphthene on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)						
					Frameshift type			
					TA1537			
S9mix (-)	0				10	11	9	( 10 ± 1.0 )
	5.00				9	16	17	( 14 ± 4.4 )
	10.0				22	18	16	( 19 ± 3.1 )
	15.0				13	19	4	( 12 ± 7.5 )
	20.0				8	13	18	( 13 ± 5.0 )
	25.0				16	17	15	( 16 ± 1.0 )
Positive control S9 mix (-)	Chemical				9AA			
	Dose (µg /plate)				80			
	Number of colonies / plate				725	1204	1329	( 1086 ± 318.8 )

9AA: 9-Aminoacridine  
Purity was above 99.9%.





