最終報告書

2-ナフチルイソブチルエーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号:9889 (115-208)

平成19年8月16日

試験委託者 厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

要	約		5
1.	表題…		6
2.	試験目	的	6
3.	遵守し	たGLPおよび準拠したガイドライン	6
4.	試験番	号	6
5.	試験施	設	6
6.	試験委	託者	6
7.	試験責	任者	6
8.	被験物	質等管理責任者	7
9.	分担責	任者	7
10.	主担当	者および試験従事者	7
11.	資料保	存施設管理責任者	7
12.	試験日	程	7
13.	被験物	質	8
14.	試験材	料および方法	10
15.	試験結	果	18
16.	考察お	よび結論	20
1 7 .	参考文	献	21
18.	参考と	した資料	21
19.	試験関	保資料の保存	22
20.		ることができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および	
	試験計	画書に従わなかったこと	22
Figu	res		
Figu	re 1	Dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether in strain TA100	23
Figu	re 2	Dose-finding study of 2- naphthylisobutyl ether in strain TA1535	24
Figu	re 3	Dose-finding study of 2- naphthylisobutyl ether in strain WP2uvrA	25
Figu	re 4	Dose-finding study of 2- naphthylisobutyl ether in strain TA98	26
Figu	re 5	Dose-finding study of 2- naphthylisobutyl ether in strain TA1537	27
Figu	re 6	Dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether in strain TA100 (Additional study)	28
Figu	re 7	Dose-finding study of 2- naphthylisobutyl ether in strain TA1535 (Additional study)	29
Figu	re 8	Dose-finding study of 2- naphthylisobutyl ether in strain TA98 (Additional study)	30
Fion	re Q	Dose-finding study of 2, naphthylisobutyl ether in strain TA 1537 (Additional study)	31

Exp. No. 9889 (115-208) FINAL REPORT

Figure 10	Bacterial reverse mutation test of 2- naphthylisobutyl ether in strain TA100	32
Figure 11	Bacterial reverse mutation test of 2- naphthylisobutyl ether in strain TA 1535	33
Figure 12	Bacterial reverse mutation test of 2- naphthylisobutyl ether in strain WP2wrA	34
Figure 13	Bacterial reverse mutation test of 2- naphthylisobutyl ether in strain TA98	35
Figure 14	Bacterial reverse mutation test of 2- naphthylisobutyl ether in strain TA1537	36
Tables		
Table I	Summary data on dose-finding study of 2- naphthylisobutyl ether	
	[Non-activation method: -S9]	37
Table 2	Summary data on dose-finding study of 2- naphthylisobutyl ether	
	[Activation method: +S9]	38
Table 3	Summary data on dose-finding study of 2- naphthylisobutyl ether (Additional study)	
	[Non-activation method: -S9]	39
Table 4	Summary data on dose-finding study of 2- naphthylisobutyl ether (Additional study)	
	[Activation method: +S9]	40
Table 5	Summary data on bacterial reverse mutation test of 2- naphthylisobutyl ether	
	[Non-activation method: -S9]	41
Table 6	Summary data on bacterial reverse mutation test of 2- naphthylisobutyl ether	
	[Activation method: +S9]	43

要 約

当該試験条件下において、2-ナフチルイソブチルエーテル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。

2-ナフチルイソブチルエーテルの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株, TA98株, TA1535株およびTA1537株ならびに大腸菌 (Escherichia coli) WP2uvrA 株を用いた復帰突然変異試験を行った.

その結果、2-ナフチルイソブチルエーテル処理では、0.105~5000 µg/プレートのいずれの用量においても、ラット肝ミクロソーム(S9)添加の有無にかかわらず、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した.

また, 用量設定試験, 同一追試験および本試験により, 試験結果の再現性が確認された.

1. 表題

2-ナフチルイソブチルエーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験

2. 試験目的

被験物質の遺伝子突然変異誘発性を検討するため、細菌を用いた復帰突然変異試験を 実施する.

3. 遵守した GLP および準拠したガイドライン

GLP.

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17 ガイドライン
- 新規化学物質等に係る試験の方法について(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第2号, 環保企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 471 (21st July 1997: Bacterial Reverse Mutation Test)

4. 試験番号

9889 (115-208)

5. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター(略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

6. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号 厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室 Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

7. 試験責任者

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

Tel: 0538-58-3572 Fax: 0538-58-1368

実験終了日:

平成18年8月17日

試験終了日:

平成19年8月16日

13. 被験物質

13.1. 被験物質名

2.ナフチルイソブチルエーテル

- 13.2. ロット番号
- 13.3. 純度

99.1%

- 13.4. 製造元
- 13.5. 購入年月日

平成18年4月24日

13.6. 購入量

500 g

13.7. 保存条件

冷蔵・遮光・除湿

13.8. 保存場所

安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫

• 7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch.72

保存期間: 2006年4月24日~同年7月10日

実測値:3.0~7.4℃

• 6号館2階被験物質調製室内バイオマルチクーラー ch. 41

保存期間: 2006年7月10日~同年8月15日(最終使用日)

実測値:5.0~6.6℃

13.9. 一般名

2-イソプトキシナフタレン

13.10. 化学名

2-Naphthylisobutyl ether

13.11. CAS No.

2173-57-1

13.12. 化学構造

13.13. 分子式

C14H16O

13.14. 分子量

200.28

13.15. 物質の状態

白色結晶塊

13.16. 融点

32.4℃ (凝固点)

13.17. 引火点

68°C

13.18. 溶解性

水:不溶

DMSO:可溶(50 mg/mL以上)

13.19. 安定性

通常の取り扱い条件においては安定.

13.20. 取り扱い上の注意

酸化剤との接触に注意する. 引火性が強く, 燃焼しやすい液体.

取り扱いは換気の良い場所で行い、粉塵が飛散しないように注意する.

適切な保護具を着用し、吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れないようにする.

13.21. 安定性分析

13.21.1. 安定性の確認方法

実験終了後に純度分析を実施した結果、純度が99.6%(判定基準:98%以上)であったことから、被験物質の実験期間中の安定性が確認された.

純度分析の詳細を Reference data 1 に示す.

13.21.2. 安定性分析用被験物質の保存条件

安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫

7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch. 72

保存期間: 2006年4月24日~同年9月13日(最終使用日)

実測値:3.0~7.7℃

13.22. 残余被験物質の処理

実験終了後, 1.0 g の被験物質を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは専用の容器に廃棄した。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験のガイドラインで指定されている次の 5 種類の菌株 を使用した.

ネズミチフス菌	TA 100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
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)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
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)
大腸菌	WP2uvrA	(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 1983 年 9 月 6 日にカリフォルニア大学 から,また,大腸菌については 1983 年 3 月 16 日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた.

2005年8月30日~同年9月1日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。

各菌株の保存は、菌懸濁液にジメチルスルホキシド (DMSO, GC 用、純度 99.9%, Lot No. K31758278, Merck) 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-U71V, 三洋電機;設定値:-80°C, 基準値:-60°C 以下) に保存した.

14.2. 培地の調製

14.2.1. 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(2006年4月1日製造, Lot No. ANI330DV, オリエンタル酵母工業)を試験に使用した. 本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地 E を含む溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである.

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示	す.

硫酸マグネシウム七水和物	0.2	g
クエン酸一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g ·
D(+) グルコース	20	g
寒天(BA-30A,Lot No. 51115,伊那食品工業)	10.4	g
精製水	1000	mL

14.2.2. トップアガー

0.5 w/v%塩化ナトリウム/0.6 w/v%寒天 (Bacto-agar, Lot No. 4246218, BD Diagnostic Systems) 水溶液をオートクレーブで滅菌した。この寒天溶液 10 容量に、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055, 関東化学) / 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 702W2180, 関東化学) 水溶液を 1 容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 211D2047, 関東化学) 水溶液を 1 容量加えた.

14.3. 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 w/v%ニュートリエントプロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. 298714, Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し, これに融解した 菌懸濁液 50 μL を接種した. フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F, タイテック) に設置し, 培養開始までの間, 設定温度 4°C に静置した. その後, 37°C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した. 試験毎に菌株の培養を実施し, 菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した.

ATPフォトメーター (ルミテスターK-100, キッコーマン) を用い、試験菌株の生菌数が 1.0×10^9 / mL以上であることを確認した、生菌数を次の表に示す。

試験	生菌数 (× 10°/mL)					
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
用量設定試験	3.71	3.05	4.37	4.18	1.57	
同一追試験	4.11	4.67		3.03	2.09	
本試験	4.05	4.53	4.23	3.66	1.67	

14.4. S9 mix

製造後 6 ヵ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-543, キッコーマン) を試験に使用した. 使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した.

14.4.1、S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法等を次の表に示す.

ロット番号	RAA-543					
製造年月日	2006年5月12日(誘導物質投与開始後5日目)					
使用動物	ラット : Sprague-Dawley 系					
性/週齡	雄/7 週齢					
体重	209~246 g					
臓器	肝臓					
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)					
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)					
投与方法	腹腔内投与					
蛋白含量	25.94 mg/mL					

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す.

S9	0.1	mL
MgCl ₂	8	μmol
KCI	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

14.5. 被験物質液の調製

被験物質は、水に不溶で、DMSOには可溶であることから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSO (SeccoSolv®、純度≥99.5%, Lot No. K32997731 【用量設定試験、同一追試験】、純度≥99.5%, Lot No. K35364331 【本試験】、Merck)に溶解させた.

用量設定試験では、使用直前に被験物質 350 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約6 mL を加え、撹拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて7 mL に定容し、調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した。この 50.0 mg/mL 調製原液 3 mLを DMSO 4.5 mL に加えることにより、20.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様に希釈を

行い, 8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 溶液を調製した.

用量設定試験(追試験)では、使用直前に被験物質 20.0 mg を精密に量り、目盛付き 試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、撹拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液 (4.00 mg/mL 溶液)を準備した。この 4.00 mg/mL 調製原液 2 mL を DMSO 3 mL に加えることにより、1.60 mg/mL 溶液を調製した。以下 同様に希釈を行い、0.64、0.256、0.102、0.0410、0.0164、0.00655、0.00262 および 0.00105 mg/mL 溶液を調製した。

本試験では、使用直前に被験物質 250 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、撹拌しながら溶解させた. さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液(50.0 mg/mL 溶液)を準備した. この 50.0 mg/mL 調製原液 3.5 mLをDMSO 3.5 mL に加えることにより、25.0 mg/mL 溶液を調製した. 以下同様に希釈を行い、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122、0.00610 および 0.00305 mg/mL 溶液を調製した.

いずれの試験においても調製後、被験物質液を速やかに使用した. なお、被験物質液(調製後 3.5 時間) に発熱、発泡、発煙等の変化は認められなかった.

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質液調製に用いる溶媒である DMSO を使用した.

14.6.2. 陽性対照

下記の陽性対照物質を試験に使用した. AF-2, 9-AAおよび2-AAは, DMSO (Lot No. K30049278, Merck) を用いて調製し、NaN3は, 注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. 5F77N, 大塚製薬工場)を用いて調製した. 各調製液を凍結保存用チューブに 0.5 mL ずつ分注し、凍結 (設定値:-80°C, 基準値:-60°C以下)保存したものを試験に用いた (使用期限:2007年12月28日).

AF-2 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (含量 99.5%, Lot No. PKE1831, 和光純薬工業)

NaN₃ アジ化ナトリウム

(純度 99.5%, Lot No. KLH1033, 和光純薬工業)

9-AA 9-アミノアクリジン塩酸塩

(純度 99.3%, Lot No. 16323JR, Sigma-Aldrich)

2-AA 2-アミノアントラセン

(含量 95.0%, Lot No. KLH1058, 和光純薬工業)

《代謝活性化系非存在下:-S9 処理》

菌株	陽性対照 物質	陽性対照 溶液調製日	用量 (μg/ プレート)	陽性対照物 質溶液濃度 (μg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2006.5.29	0.01	0.1
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2006.5.29	0.1	1.0
ネズミチフス菌 TA1535	NaN ₃	2006.5.29	0.5	5.0
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2006.5.29	80	800
大腸菌 WP2uvrA	AF-2	2006.5.29	0.01	0.1

《代謝活性化系存在下:+S9 処理》

菌株	陽性対照 物質	陽性対照 溶液調製日	用量 (μg/ プレート)	陽性対照物 質溶液濃度 (µg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2006.5.29	1.0	10
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2006.5.29	0.5	5.0
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2006.5.29	2.0	20
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2006.5.29	2.0	20
大腸菌 WP2uvrA	2-AA	2006.5.29	10	100

なお、これらの用量は「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」 (労働省安全衛生部化学物質調査課編、1991年) に準じて設定した。

14.6.3. 無菌試験

被験物質液 (調製原液) ならびに S9 mix については無菌試験を実施した. すなわち、 調製原液 100 μL あるいは S9 mix 500 μL 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.

2-ナフチルイソブチルエーテル調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

14.7. 用量設定試験(予備試験)

14.7.1. 用量

用量設定試験における被験物質の用量として,ガイドライン上定められた 5000 μg/ プレートを最高用量とし,以下,2000,800,320,128,51.2,20.5 および 8.19 μg/プレートを設定した.

14.7.2. 使用プレート数および識別方法

1用量当たり3枚のプレートを用いた.

油性インクを用いて、試験菌株、S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを識別した。

14.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に使用溶媒,被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μL,次いで,代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の場合は, 0.1 mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) 500 μL を,代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の場合は, S9 mix 500 μLを分注した. さらに,前培養した試験菌株懸濁液 100 μL を加えた後,ウォーターバスシェーカー (MM-10,タイテック)を用いて37℃,120回/分の条件で20分間振盪した(プレインキュベーション). 振盪終了後,トップアガー2 mL を添加し,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. 恒温器 (SSV-R11DA,池田理化)を用い、各プレートを37℃の条件で48時間培養した.

14.7.4. 析出等の観察

各処理法において, 処理開始時およびコロニー数計測時に被験物質析出等の有無を肉 眼で観察した.

14.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株(背景菌)の生育状態について実体顕微鏡(×40)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数を計測した.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)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.生育阻害あるいは析出物によりコロニーアナライザーの使用が不適当な場合は、目視でコロニー数を計数した.

14.8. 用量設定試験(追試験)

14.8.1. 用量

用量設定試験で、-S9 処理の WP2uvrA 株以外の菌株ならびに+S9 処理の TA100 株、TA1535 株および TA1537 株において、低用量まで生育阻害が認められ、生育阻害を示さなかった用量は4 用量未満あるいは4 用量以下しか得られなかった。したがって、さらに低用量を設定し、用量設定試験(追試験)を実施した。用量設定試験(追試験)における被験物質の用量として、次表に示す7 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在】	Б.	_50	処理》

菌株			用量(μg/プレ	ー ト)		
TA100	0.105	0.262	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6
TA1535	0.105	0.262	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6
TA98	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160
TA1537	0.105	0.262	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6
《代謝活性化系存	存在下:+S9	処理》					
菌株			用量(μg/プレ	ート)	13,000,000	
TA100	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160
TA1535	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160
TA1537	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160	400

- 14.8.2. 使用プレート数および識別方法
 14.7.2.に記載した方法に準じた.
- 14.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件 14.7.3.に記載した方法に準じた.
- 14.8.4. 析出等の観察14.7.4.に記載した方法に準じた.
- 14.8.5. コロニー数計測14.7.5.に記載した方法に準じた。

14.9. 本試験

14.9.1. 用量

用量設定試験および用量設定試験(追試験)の結果,-S9 処理および+S9 処理のいずれの試験菌株においても変異原性は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、用量設定試験で-S9 処理および+S9 処理の WP2uvrA 株以外の菌株において、低用量または中用量まで認められた。また、用量設定試験(追試験)においては、実施した全ての試験菌株(-S9 処理の TA100 株, TA98 株, TA1535 株, TA1537 株, +S9 処理の TA100 株, TA1535 株, TA1537 株, +S9 処理の TA100 株, TA1535 株, TA1537 株, +S9 処理の TA100 株, TA1535 株, TA1537 株)の高用量(菌株により 10.2~400 μg/プレート)で生育阻害が認められた。したがって、本試験における被験物質の用量として、WP2uvrA 株においては、5000 μg/プレートを最高用量とし、それ以外の菌株においては、生育阻害作用が認められると考えられる用量を最高用量として、次表に示す6または7 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下	· CO \$11.111
	07 X "JF/

(() (物))口(工)ロントラ	Literia						
菌株			用量	(μg/プレ	ート)		
TA100	0.305	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5
TA1535	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1
WP2uvrA	*	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
TA1537	0.305	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5
《代謝活性化系符	存下: +S9	処理》					
菌株		,	用量	(μg/プレ	← ト)		
TA100	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
TA1535	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
WP2uvrA	- '	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250
TA1537	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313

14.9.2. 使用プレート数および識別方法 14.7.2.に記載した方法に準じた.

14.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

14.7.3.に記載した方法に準じた. ただし、プレインキュベーションにはウォーターバスシェーカー $(M-100^{N}, 947 - 947)$ を用いた.

14.9.4. 析出等の観察

14.7.4.に記載した方法に準じた.

14.9.5. コロニー数計測

14.7.5.に記載した方法に準じた.

14.10. 試験成立条件

- a. 陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、背景データから求めた基準 値内であること
- b. 陽性対照のコロニー数は、同時に実施する陰性対照値の2倍を超えること 上記の条件を満たした場合に、試験は成立したと判断した。

14.11. 結果の解析

平均復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現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.

15. 試験結果

15.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示す.

2-ナフチルイソブチルエーテル処理では、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験 菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、-S9 処理および+S9 処理の大腸菌 WP2uvrA 株を除く 4 菌株では、低用量あるいは中用量以上の用量において試験菌株に対する生育阻害作用が認められた。なお、-S9 処理の TA100 株における 800 μg/プレート以上の用量で、強い生育阻害の影響により、コロニーアナライザーでは栄養要求性菌株のコロニーと変異株のコロニーが判別できなかったため、目視によりコロニー数を計数した。

陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

15.2. 被験物質の析出等(用量設定試験)

処理開始時に、-S9 処理では 51.2 μg/プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ、さらに、800 μg/プレート以上の用量では透明油滴状の析出物が観察された。 +S9 処理では 320 μg/プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ、さらに、800 μg/プレート以上の用量で白色粉末状の析出物および透明油滴状の析出物が観察された。

コロニー数計測時においては、-S9 および+S9 処理ともに 2000 μg/プレート以上の 用量で白色粉末状の析出物がみられ、さらに、5000 μg/プレートでは透明油滴状の析 出物が観察された。

TA100 株の 800 μg/プレートにおいて、強い生育阻害の影響により、コロニーアナライザーでは栄養要求性菌株のコロニーと変異株のコロニーとが判別できなかったため、目視によりコロニー数を計数した。また、析出物の影響により、-S9 処理の 2000 μg/プレート以上の用量および+S9 処理の 5000 μg/プレートでは、コロニーアナライザーの使用が不適当と判断し、目視によりコロニー数を計数した。

15.3. 用量設定試験一追試験

結果を Figure 6~9 および Table 3, 4 に示す.

2-ナフチルイソブチルエーテル処理では、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理、TA100 株および TA1537 株の $10.2 \, \mu g$ / プレート以上の用量、TA1535 株の $25.6 \, \mu g$ / プレート,TA98 株の $160 \, \mu g$ / プレートならびに+S9 処理、TA100 株および TA1535 株の $160 \, \mu g$ / プレート,TA1537 株の $160 \, \mu g$ / プレート以上の用量で認められた。

陽性対照物質は、試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した、

15.4. 被験物質の析出等(用量設定試験ー追試験)

処理開始時, -S9 処理の 64.0 μg/プレート以上の用量および+S9 処理の 400 μg/プレートで反応液に白濁が生じたが, コロニー数計測時には, 析出等の変化は観察されなかった.

15.5. 本試験

結果を Figure 10~14 および Table 5, 6 に示す.

2-ナフチルイソブチルエーテル処理では、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験 菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理、TA100 株の 19.5 $\mu g/プレート$ 、TA1535 株の 39.1 $\mu g/プレート$ 、TA98 株の 156 $\mu g/プレート以上の用量、<math>TA1537$ 株の 9.77 $\mu g/プレート以上の用量ならびに<math>+S9$ 処理、TA100 株の 78.1 $\mu g/プレート以上の用量、<math>TA1535$ 株および TA1537 株の 156 $\mu g/プレート以上の用量、<math>TA98$ 株の 1250 $\mu g/プレートで認められた。$

陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

15.6. 被験物質の析出等(本試験)

処理開始時に、-S9 処理では $78.1 \, \mu g$ /プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ、さらに、 $625 \, \mu g$ /プレート以上の用量では透明油滴状の析出物が観察された。+S9 処理では $313 \, \mu g$ /プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ、さらに、 $625 \, \mu g$ /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、 $1250 \, \mu g$ /プレート以上の用量では透明油滴状の析出物も観察された。

コロニー数計測時において、-S9 処理では 1250 μg/プレート以上の用量で白色粉末 状の析出物が、さらに、2500 μg/プレート以上の用量で透明油滴状の析出物が観察さ れた、+S9 処理では 2500 μg/プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、さらに、 5000 μg/プレートで透明油滴状の析出物が観察された。

析出物の影響により、-S9 処理の 1250 μg/プレート以上の用量および+S9 処理の 5000 μg/プレートではコロニーアナライザーの使用が不適当であったため、目視でコロニーを計数した。

16. 考察および結論

2-ナフチルイソブチルエーテルの遺伝子突然変異誘発性を検討するため、細菌(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.

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 μg/プレートあるいは試験菌株の生育を阻害する用量を設定し、試験を行った。その結果、2-ナフチルイソブチルエーテル処理群では、-S9 処理および+S9 処理の全ての試験菌株において、陰性対照と比較し、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

これら両処理法での試験結果は、用量設定試験、同一追試験および本試験により、再現性が確認された.

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ (Appendix 1) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験 は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、2-ナフチルイソブチルエーテルの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定された.

なお、これまでに2-ナフチルイソブチルエーテルの遺伝毒性および発がん性に関する報告はない。類縁体である naphthalene は、細菌およびヒト細胞株での遺伝子突然変異試験で陰性、CHO 細胞、リンパ球および着床前のマウス胚を用いた染色体異常試験で陽性との報告がある¹⁾. さらに、マウス骨髄での染色体異常誘発は認められないが、ショウジョウバエの翅毛スポット試験で陽性反応が認められている¹⁾. 1-Methylnaphthalene および2-methylnaphthalene は、ヒトリンパ球において姉妹染色分体交換を誘発し、さらに、1-methylnaphthalene は、弱いながらも染色体異常も誘発すると報告されている²⁾. 2-Naphthylamine は、マウス骨髄小核試験で明確な陽性反応がみられている³⁾. Glycidil 1-naphthyl ether は、細菌を用いた復帰変異試験で陽性⁴⁾、マウスリンパ球での染色体異常試験で陽性、マウス骨髄での染色体異常試験で陽性⁴⁾、マウスリンパ球での染色体異常試験で陽性、マウス骨髄での染色体異常試験で陽性との報告もある⁵⁾

17. 参考文献

- Schreiner CA.: Genetic toxicity of naphthalene: a review. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2003, 6(2): 161-183.
- Kulka U, Schmid E, Huber R, Bauchinger M.; Analysis of the cytogenetic effect in human lymphocytes induced by metabolically activated 1- and 2-methylnaphthalene. Mutat. Res. 1988, 208(3-4): 155-158.
- Mirkova E, Ashby J.: Activity of the human carcinogens benzidine and 2-naphthylamine in male mouse bone marrow micronucleus assays. Mutagenesis 1988 Sep, 3(5): 437-439.
- 4) Einisto P, Hooberman BH, Sinsheimer JE.: Base-pair mutations caused by six aliphatic epoxides in Salmonella typhimurium TA100, TA104, TA4001, and TA4006. Environ Mol Mutagen. 1993, 21(3): 253-257.
- Das L, Das SK, Chu EH, Sinsheimer JE.: Chromosomal aberrations in mouse lymphocytes exposed in vivo and in vitro to aliphatic epoxides. Mutat. Res. 1993, 299(1): 19-24.

18. 参考とした資料

- Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc Nat Acad Sci 1973; 70: 782-6.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens. a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Nat Acad Sci USA. 1973; 70 (8): 2281-5.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975; 31: 347-64.
- Yahagi T. [Screening methods using microbes for the environmental carcinogens (author's transl)]. [Article in Japanese]. Protein, Nucleic Acid and Enzyme 1975; 20: 16-27.
- Ministry of Labor, Industrial Safety and Health Department. [Test Guidelines and GLP for Mutagenicity Test using Microorganisms in the Safety and Health Law]. Tokyo; Japan Industrial Safety and Health Association; 1991.
- Ishidate M Jr editor. [The data book for mutagenicity assay using microorganisms]. [Article in Japanese]. Life-science Information Center Press; 1991.

19. 試験関係資料の保存

当該試験の下記資料は、安評センター資料保存施設にて最終報告書作成後 10 年間保存される。その後の保存については、試験委託者と安評センターで協議の上、別途定める。

- 試験計画書(正本)
- 被験物質 (1.0g), 被験物質に関する資料 (使用記録, 調製記録, その他)
- 生データ (Ames 試験実施記録, Ames 試験菌株前培養記録, 背景菌観察結果, Ames 試験結果, その他)
- 最終報告書(正本)、化学物質審査規制法届出様式(写し)
- その他の試験関係資料
- 20. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画 書に従わなかったこと

1. 【内容】

試験計画書の変更書(I)のp.3/4の(5)14.8.1 用量の項目に「用量設定試験で代謝活性化系非存在下のWP2wrA株以外の菌株、代謝活性化系存在下のTA100、TA1535 およびTA1537株において低用量まで生育阻害が認められ、生育阻害を示さない用量が4用量得られなかった。」と記載されている。しかし、代謝活性化系存在下のTA1535株においては生育阻害を示さない用量は4用量あり、評価は可能であったが、当該菌株についても用量設定試験(追試験)を実施した。

【判定】

遺伝毒性試験ガイドラインでは、用量設定試験および本試験の2回の試験で再現性を 得ることとしているが、3回繰り返した試験でも結果の再現性が得られていることから、 本逸脱が試験の信頼性に及ぼす影響はないと判断した.

-□-[Activation method: +S9]

── [Non-activation method : -S9]

Figure 1. Dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether in strain TA100

- 23 -

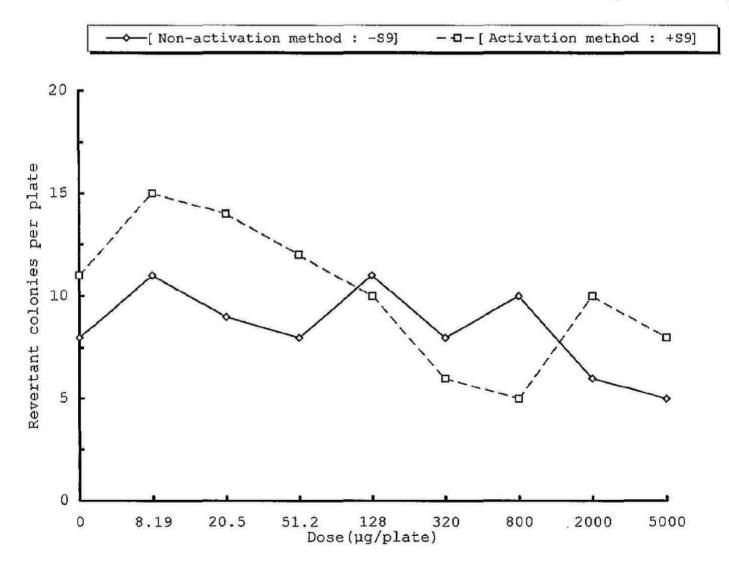


Figure 2. Dose-findin study of 2-naphthylisobutyl ethar in strain TA1535

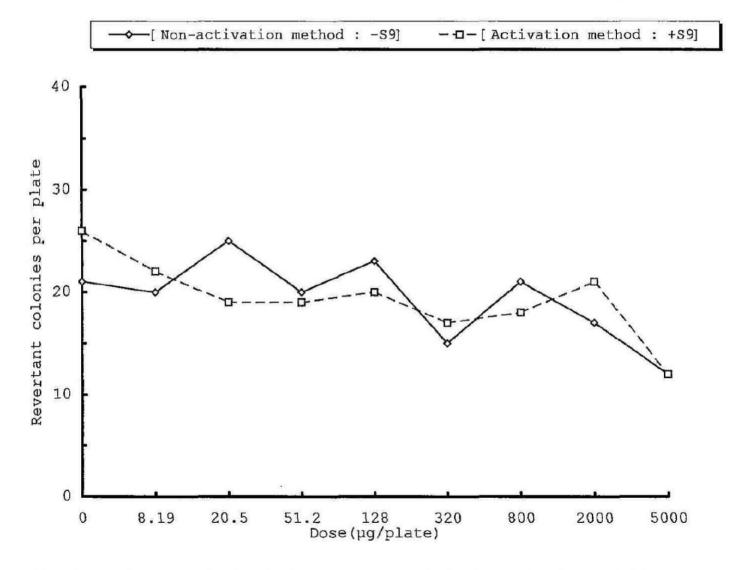


Figure 3. Dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether in strain WP2uvrA

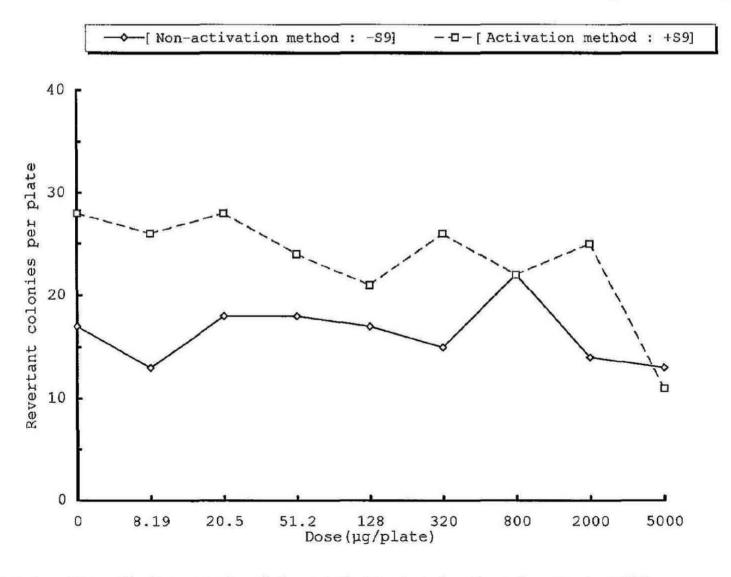


Figure 4. Dose-finding study of 2-naphthylisobutyl etar in strain TA98

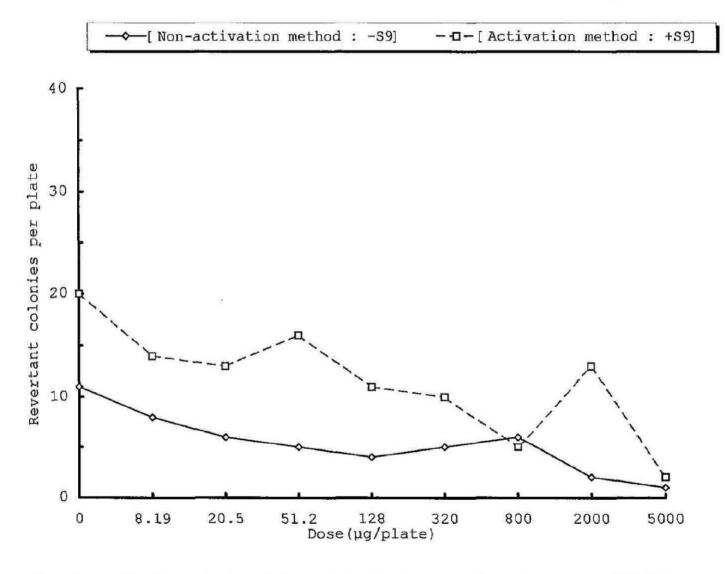


Figure 5. Dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether in strain TA1537

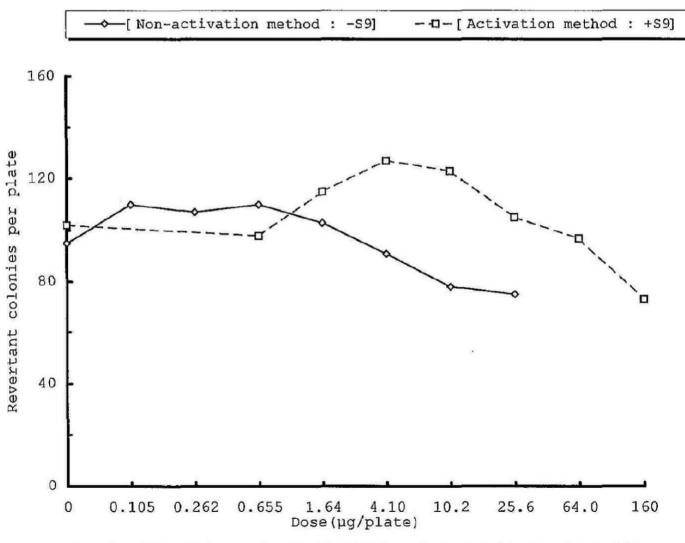
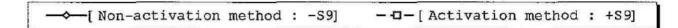


Figure 6. Dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether in strain TA100 (Additional study)



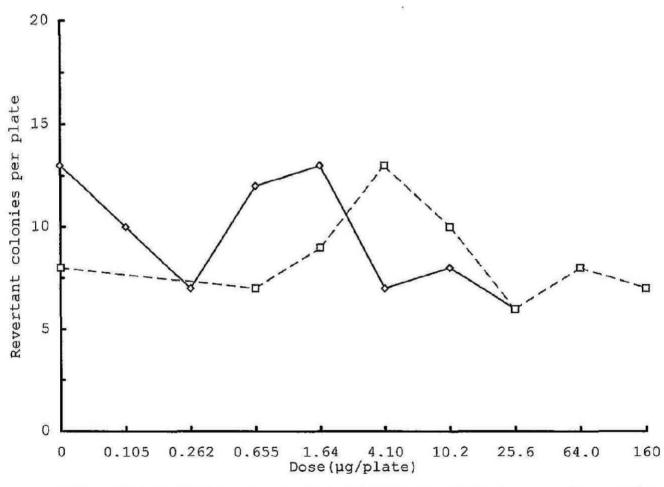


Figure 7. Dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether in strain TA1535 (Additional study)

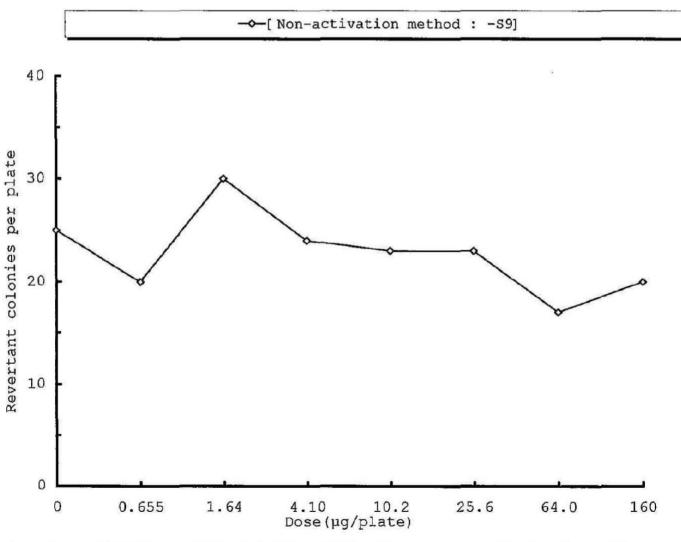


Figure 8. Dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether in strain TA98 (Additional study)

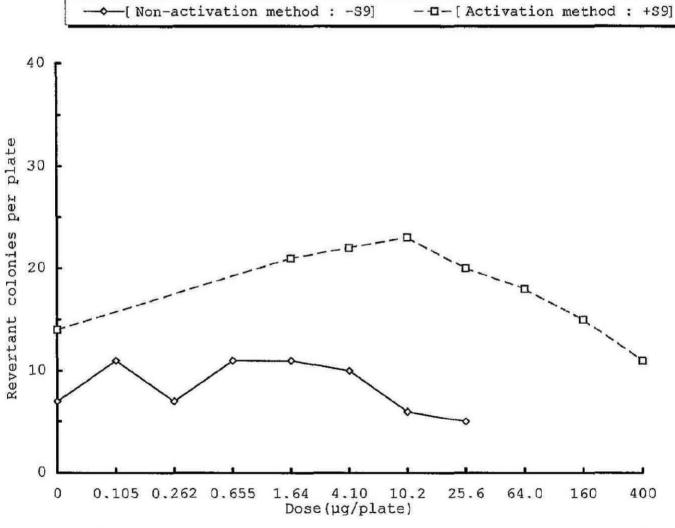


Figure 9. Dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether in strain TA1537 (Additional study)

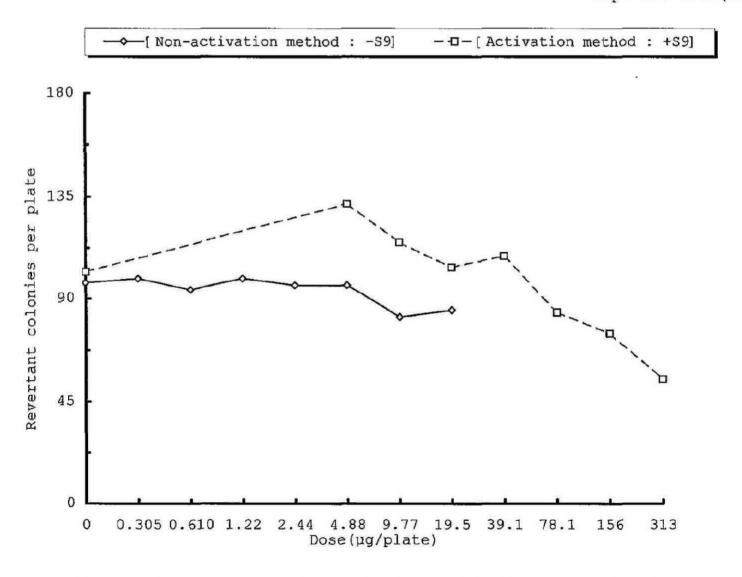


Figure 10. Bacterial verse mutation test of 2-napht isobutyl ether in strain TA100

Figure 11. Bacterial reverse mutation test of 2-naphthylisobutyl ether in strain TA1535

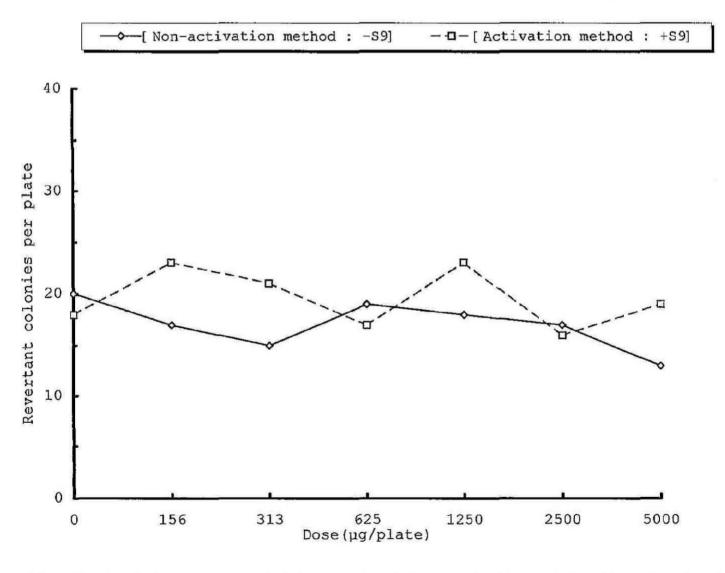


Figure 12. Bacterial rev rse mutation test of 2-naphthylisobutyl ether in strain WP2uvrA



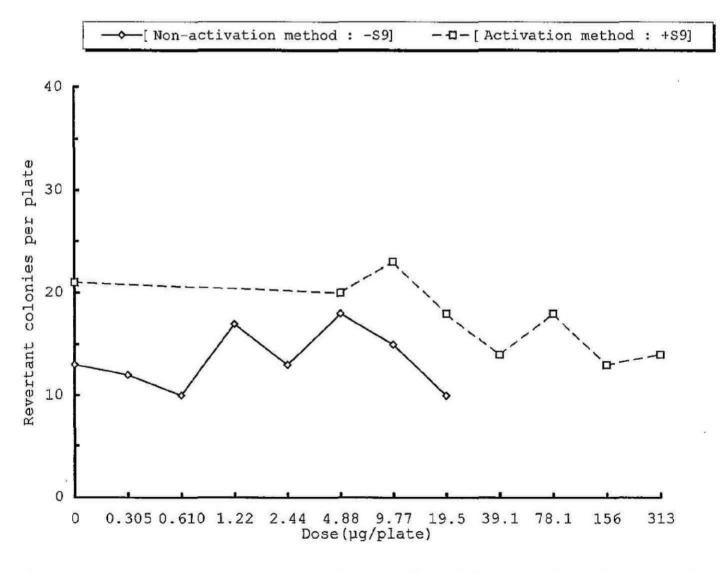


Figure 14. Bacterial verse mutation test of 2-naphthylisobutyl ether in strain TA1537

Summary data on dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether [Non-activation method: -S9]

							Reve	ertant co	olonie	s per pl	Late [Me	an±S.D.	.1				
Compound	Dose (µg/plate)		TA100		т	A1535	***************************************	W	P2uvrA		TA98			TA1537		
DMSO a)	0	Γ	103 96	100 ±	84 10][9	7 ±	9 1][22 21	20 ±	22 1][16 17	22 ±	14 4][10 11	13 ±	9 2]
2-naphthylisobut	yl 8.19	ſ	89 90	89 ±	92 2][11 11	11 ±	12 1][20 20	24 ±	1.7 4][12 13	12 ±	15 2][7	7 ±	9 1]
	20.5	1	79* 83	89* ±	80* 6][7* 9	12* ±	7* 3][23 25	21 ±	32 6][13 18	23 ±	17 5][6* 6	8* ±	4* 2]
	51.2	[67* 74	83* ±	72* 8][6* 8	±	11* 3][1.8 20	26 ±	15 6][23 18	15 ±	16 4][8* 5	5* ±	3* 3]
	128	ε	53* 53	54* ±	52* 1][9* 11	1.4* ±	10* 3][21 23	25 ±	24 2](12* 17	19* ±	19* 4][6* 4	3* ±	3* 2]
	320	[48* 46	47* ±	42* 3][8*	6* ±	9* 2][18 15	14 ±	13 3][14* 15	18* ±	14* 2][3* 5	7* ±	5* 2]
	800	[4* 4	4* ±	3* 1][6* 10	10* ±	13* 4][19 21	21 ±	22 2][22* 22	21* ±	24* 2][6* 6	6* ±	7* 1]
	2000 +	[1* 1	2* ±	0* 1][6* 6	6* ±	5* 1][19 17	16 ±	16 2](11* 14	14* ±	17* 3][3* 2	1* ±	3* 1]
	5000 +	ſ	3* 1	0* ±	0* 2][10* 5	2* ±	2* 5](17 12	12 ±	7 5](15* 13	14* ±	9* 3][2* 1	1* ±	1* 1]
Positive control Dose(µg/plate)	compound	1		AF-2 0.01	74.9/54		NaN ₃			AF-2 0.01			AF-2 0.1			9-AA 80	
Revertant coloni	es er plate]	677 698	694 ±	724 24][616 625	616 ±	644 16][105 103	105 ±	99 3][631 673	717 ±	672 43][311 373	465 ±	342 81]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaNa: Sodium azide

9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

- 37 -

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 pL/plate)

^{* :} Growth inhibition was observed.

^{+ :} Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether [Activation method: +S9]

Compound	Dose						Reve	rtant co	olonie	s per p	late [Me	an±S.D	.]					
	(µg/plate	∍)		TA100		Т	TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	ι	104 104	92 ±	116 12][12 11	9 ±	12 2][31 26	20 ±	27 6][28 28	27 ±	29 1][25 20	15 ±	20 5]	
2-naphthylisobut; ether	yl 8.19	£	114 122	133 ±	119 10][15 15	20 ±	10 5 H	23 22	25 ±	19 3][23 26	30 ±	26 4][13 14	17 ±	13	
	20.5	Ţ	119 114	112 ±	110 5][12 14	17 ±	13 3][19 19	17 ±	20 2](31 28	24 ±	30 4][10 13	11 ±	19 5	
	51.2	[98 109	112 ±	116 9][13 12	8 ±	15 4][16 19	21 ±	21 3]{	25 24	24 ±	23 1][20 16	14 ±	13	
	128	[86* 84	75* ±	91* 8][15 10	6 ±	8 5][18 20	24 ±	19 3][20 21	25 ±	17 4][13* 11	10* ±	11* 2	
	320	ι	63* 69	68* ±	77* 7][6* 6	6* ±	7* 1](21 17	15 ±	15 3][22 26	28 ±	29 4][11* 10	6* ±	13* 4	
	800	1	59* 58	56* ±	59* 2][6* 5	5* ±	4* 1][20 18	14 ±	19 3 H	29* 22	20* ±	17* 6][4* 5	4* ±	6* 1	
	2000 +	[49* 57	58* ±	64* 8][12* 10	5* ±	13* 4][16 21	19 ±	27 6][24* 25	31* ±	21* 5][12* 13	11* ±	16* 3	
	5000 +	[29* 34	39* ±	35 * 5][11* 8	8* ±	5* 3][8 12	16 ±	12 4][9* 11	11* ±	12* 2][2* 2	1* ±	3* 1	
Positive control Dose(µg/plate)	compound	d	a # 1	2-AA 1			2-AA 2			2-AA 10			2-AA 0.5			2-AA 2	1950-00-1	
Revertant coloni	es er plate	(1149 1075	1062 ±	1013 69][355 355	381 ±	330 26][561 599	614 ±	623 34][343 363	357 ±	388 23][146 145	127 ±	161 17	

²⁻AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

^{* :} Growth inhibition was observed.

^{+ :} Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Summary data on dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether (Additional study)[Non-activation method: -S9]

a	-			R	everta	nt colo	nies per	plate	[Meand	[.d.8				
Compound	Dose (µg/plate)		TA100		1	A1535			TA98		'	rA1537		
DMSO a)	0	88 95	93 ±	104 8][12 13	13 ±	15 2][18 25	26 ±	30 6][5 7	9 :t	8 2]	
2-naphthylisobu ether	tyl 0,105	107 110	117 ±	105 6][9 10	13 ±	9 2]			1	9 11	11 ±	12 2]	
	0.262	99 107	114 ±	109 8][5 7	9 ±	6 2]			ı	9	5 ±	6 2]	
	0.655 [118 110	105 ±	108 7][8 12	16 ±	11 4][20 20	21 ±	20 1]{	13 11	Ŧ 8	12 3]	
	1.64	96 103	105 ±	107 6][15 13	11 ±	13 2][29 30	30 ±	31 1][10 11	13 ±	11 2]	
	4.10	77 91	93 ±	103 13][5	9 ±	8 2][27 24	24 ±	20 4][11 10	10 ±	8 2]	
	10.2 [70* 78	88* ±	75* 9][7 8	9 ±	8 1][20 23	25 ±	24 3][8* 6	5* ±	4* 2]	
	25.6 [71* 75	77* ±	76* 3][3* 6	5* ±	9* 3][26 23	21 ±	22 3][5* 5	2* ±	7* 3]	
	64.0						ĺ	16 17	21 ±	14 4]				
	160						ſ	21* 20	22* ±	16* 3]				
Positive contro Dose(µg/plate) Revertant colon	-	606 587	AF-2 0.01 573	583 17](573 554	NaN ₃ 0.5 535 ±	554 19][590 585	AF-2 0.1 589	575 8][321 347	9-AA 80 373	346 26]	5-3-71

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide NaN3: Sodium azide 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate) *: Growth inhibition was observed.

Table 4. Summary data on dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether (Additional study)[Activation method: +S9]

Company	Dogo			Reve	ertant co	olonie	s per p	late [Me	an±S.D	.]	
	Dose (µg/plat	:e)		TA100			TA1535		2	A1537	
DMSO a)	0	ŧ	106 102	96 ±	103 5][7	9 ±	9 1][15 14	16 ±	12 2]
2-naphthylisobut ether	yl 0.65	5 [100 98	106 ±	87 10][8 7	6 ±	8 1]			
	1.64	(114 115	123 ±	109 7][9 9	7 ±	10 2][21 21	23 ±	18 3]
	4.10	ı	115 127	128 ±	139 12][15 13	11 ±	12 2][22 22	20 ±	25 3]
	10.2	ſ	124 123	117 ±	127 5][10 10	8 ±	12 2][23 23	21 ±	26 3]
	25.6	1	97 105	103 ±	116 10 H	8	5 ±	6 2][17 20	21 ±	23 3]
	64.0	I	98 97	90 ±	104 7 <u>]</u> [11 8	7 ±	6 3][16 18	23 ±	16 4]
	160	Į	75* 73	68* ±	75* 4]{	7* 7	8* ±	6* 1][16* 15	15* ±	14* 1]
	400							E	5* 11	12* ±	15* 5]
Positive control Dose(µg/plate)		nd		2-AA 1			2-AA 2			2-AA 2	
Revertant coloni	es er plate) (1007 962	973 ±	905 52][356 343	323 ±	349 17][126 122	122 ±	119 4]

²⁻AA: 2-Aminoanthracene
a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)
*: Growth inhibition was observed.

Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-naphthylisobutyl ether [Non-activation method : -89]

G	5					Reve	rtant co	lonies	per p	late [Mea	an±S.D.	1				
Compound (Dose - µg/plate)		TA1.00		T	A1535		WE	2uvrA		TA98			TA1537		
DMSO a)	0	94 97	101 ±	96 4][9	14 ±	20 6][20 20	22 ±	19 2](21 19	20 ±	16 3][12 13	12 ±	15 2
2-naphthylisobu ether	tyl 0.305	92 99	100 ±	105 7]									Į.	13 12	16 ±	8
	0.610 {	89 94	98 ±	96 5][12 13	¥	19 6]						ı	12 10	8 ±	11 2
	1.22	96 99	107 ±	93 7][16 18	14 ±	24 5]						1	15 17	17 ±	19 2
	2.44	102 96	92 ±	93 6][13 17	10 ±	27 9]						1	15 13	11 ±	13 2
	4.88 [89 96	89 ±	109 12][13 15	18 ±	14 3]			t	20 23	24 ±	24 2][21 18	15 ±	18
	9.77 [82 82	84 ±	2][80	9 12	12 ±	14 3]			1	19 19	14 ±	24 5][19* 15	16* ±	11* 4
	19.5 [84* 85	91* ±	79* 6][11 10	5 ±	13 4 J			. [25 19	15 ±	18 5][9* 10	5* ±	1 7* 6
	39.1			1	5* 10	10* ±	15* 5]			Ţ	24 22	20 ±	21 2]			
	78.1									ι	16 15	12 ±	18 3]			
	156						Ţ	17 17	17 ±	16 1][16* 17	13* ±	23* 5]			
	313						ſ	20 15	12 ±	14 4][16* 15	16* ±	14*			
	625						1	21 19	19 ±	18 2]						

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate) * : Growth inhibition was observed.

		Revertant colonies per plate [Mean±S.D.]														
Compound Dose (µg/plate		TA100		TA1535			W	NP2uvrA		TA98				IA1537		
2-naphthylisobutyl 1250 ether	+					[16 18	13 ±	24 6]					****		
2500	t					Į.	12 17	18 ±	22 5]							
5000	+						10 13	13 ±	16 3]							
Positive control compou Dose(µg/plate) Revertant colonies per plat	531	AF-2 0.01 602 ±	550 37][585 605	NaN ₃ 0.5 603	627 21][110 103	AF-2 0.01 92 ±	107 10)(806 785	AF-2 0.1 743	805 36][334 347	9-AA 80 390	317 38	

AF-2: 2-(2-Fury1)-3-(5-nitro-2-fury1)acrylamide NaN3: Sodium azide + : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

43 -

Table 6. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-naphthylisobutyl ether [Activation method: +S9]

- 600 ×	- 30 # A					Reve	ertant c	olonie	s per p	late [Me	an±S.D	1.]					
ompound	Dose (µg/plate)		TA100			TA1535		W	WP2uvrA			TA98			TA1537		
MSO a)	0	99 102	112 ±	96 9][16 14	12 ±	13 2][15 18	22 ±	18 4][28 28	23 ±	32 5][21 21	22 ±	19 2]	
-naphthylis ther	obutyl 4.88	136 132	128 ±	131 4][7 12	15 · ±	13 4)						t	22 20	18 ±	19 2]	
	9.77 [118 115	116 ±	112 3](16 15	13 ±	16 2]						ι	25 23	22 ±	23 2]	
	19.5 [93 104	108 ±	110 9](13 14	13 ±	15 1]			Į.	22 25	28 ±	26 3][21 18	15 ±	18 3 }	
	39.1 [105 109	1.18 ±	104 8][9 11	7 ±	16 5]			Ţ	25 23	18 ±	25 4][16 14	14 ±	11 3]	
	78.1 [81* 84	86* ±	3][86*	8 10	10 ±	12 2]			Ţ	23 24	25 ±	23 1][22 18	12 ±	21 6]	
	156 [70* 75	67* ±	87* 11][6* 8	±	8* 3][22 23	25 ±	23 2][20 23	22 ±	28 4][12* 13	13* ±	13*	
	31 3 [54* 55	58* ±	53* 3][14* 12	13* ±	9* 3][23 21	20 ±	20 2][19 21	21 ±	24 3][16* 14	13* ±	12* 2]	
	625						Ţ	22 17	16 ±	14 4][23 27	26 ±	32 5]				
	1250						1	21 23	25 ±	22 2][27* 23	19* ±	22* 4]				
	2500 +						1	17 16	10 ±	20 5]							
	5000 +		and a second				t	17 19	19 ±	20 2]			#.D.				
ositive con ose(µg/plat evertant co		934	2-AA 1 924	980	361	2-AA 2 387	372	507	2-AA 10 530	509	398	2-AA 0.5 408	349	162	2-AA 2 149	175	
ose(µg/plat	trol compound	934 946	1	980 30][361 373	2		19	2-AA 10	2]	398 385	0.5	349 32][162 162	2	2	

²⁻AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

^{* :} Growth inhibition was observed.

^{+ :} Visible precipitation was observed at the end of exposure period.