

最 終 報 告 書

ピグメントエロー-14 の
細菌を用いた復帰突然変異試験



BOZO RESEARCH CENTER INC.

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最終報告書

ピグメントエロー-14 の
細菌を用いた復帰突然変異試験

M-1097

株式会社 **ボゾリサーチセンター**

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

試験責任者陳述書


試験番号 : M-1097

試験表題 : ピグメントエロー-14 の細菌を用いた復帰突然変異試験

本試験は以下に示す基準に準拠して実施したものであります。

- ・ “OECD Principles of Good Laboratory Practice” (as revised in 1997)

2001 年 6 月 14 日



信頼性保証陳述書

試験番号 : M-1097

試験表題 : ピグメントエロー-14 の細菌を用いた復帰突然変異試験

本試験は以下に示す基準に準拠して実施されたことを保証致します。

- ・ “OECD Principles of Good Laboratory Practice” (as revised in 1997)

調査日及び報告日

調 査 の 対 象	調 査 日	試験責任者及び運営管理者への報告日
試験計画書	2000 年 12 月 7 日	2000 年 12 月 8 日
濃度設定試験 (計数)	2001 年 1 月 19 日	2001 年 1 月 20 日
被験物質調製指示シート	2001 年 1 月 23 日	2001 年 1 月 24 日
被験物質 (調製・保存)	2001 年 1 月 24 日	2001 年 1 月 24 日
本試験 (重層)	2001 年 1 月 24 日	2001 年 1 月 24 日
本試験 (計数)	2001 年 1 月 26 日	2001 年 1 月 29 日
生データ・図・表	2001 年 3 月 22 日	2001 年 3 月 22 日
再調査	2001 年 3 月 27 日	2001 年 3 月 28 日
最終報告書草案	2001 年 3 月 22 日	2001 年 3 月 24 日
試験計画書変更書 (1)	2001 年 4 月 5 日	2001 年 4 月 6 日
生データ	2001 年 5 月 29 日	2001 年 5 月 30 日
再調査	2001 年 5 月 30 日	2001 年 5 月 30 日
最終報告書	2001 年 6 月 14 日	2001 年 6 月 14 日

目 次

	頁
目 次	1
試験実施概要	3
試験従事者一覧	5
要 約	6
緒 言	7
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び対照物質	8
1-1. 被験物質及び媒体	8
1-2. 被験液の調製	8
1-3. 対照物質	9
2. 使用菌株	11
3. 試 薬	11
4. 試験方法	13
4-1. 識別方法	13
4-2. 前培養条件	13
4-3. 濃度設定試験	14
4-4. 本試験	15
4-5. 追加確認試験	15
5. 判定基準	15
試験結果	16
考 察	18

	頁
参考文献	19
Attached Data	
Attached Data 1 Background Data of the Testing Facility	20
Tables and Figures	
Table 1 Results of Dose Range Finding Study without Metabolic Activation	21
Table 2 Results of Dose Range Finding Study with Metabolic Activation	22
Table 3 Results of Main Study without Metabolic Activation ...	23
Table 4 Results of Main Study with Metabolic Activation	24
Figure 1 Concentrations and Number of Revertant Colonies in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100	25
Figure 2 Concentrations and Number of Revertant Colonies in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98	26
Figure 3 Concentrations and Number of Revertant Colonies in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	27
Figure 4 Concentrations and Number of Revertant Colonies in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	28
Figure 5 Concentrations and Number of Revertant Colonies in <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	29

試験実施概要**1. 試験計画書**

試験番号 : M-1097

試験表題 : ピグメントエロー-14 の細菌を用いた復帰突然変異試験

2. 試験目的 : 細菌を用い、本被験物質の復帰突然変異誘発能の有無を明らかにした。**3. 試験委託者** : 経済産業省（旧通商産業省） 製品評価技術センター
〒151-0066 東京都渋谷区西原 2-49-10**4. 試験受託者** : 株式会社ボゾリサーチセンター
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11
[REDACTED]**5. 試験実施施設** : 株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284**6. 被験物質**

供給者 [REDACTED]

名称 : ピグメントエロー-14
(別名: ペンジジンエロー)

受領日 : 2000 年 9 月 14 日

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び変異原性試験室

7. 試験日程

試験開始日 : 2000 年 12 月 6 日

実験開始日 : 2001 年 1 月 17 日

濃度設定試験 : 2001 年 1 月 17 日 ~ 2001 年 1 月 19 日

本試験 : 2001 年 1 月 24 日 ~ 2001 年 1 月 26 日

実験終了日 : 2001 年 1 月 26 日

試験終了日 : 2001 年 6 月 14 日

8. 試験責任者 : 株式会社ボゾリサーチセンター 第2研究部



9. 試験担当者



10. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はみられなかった。

11. 資料の保存

試験計画書（原本）、記録文書、生データ、報告書類（最終報告書の原本を含む）は、株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、経済産業省 製品評価技術センターと株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

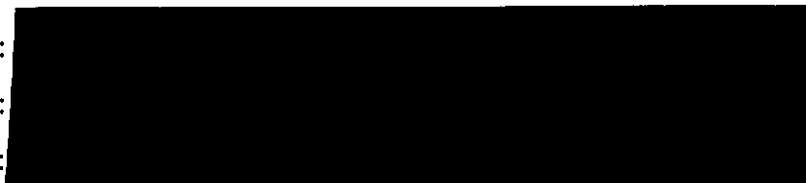
12. 試験責任者の署名又は記名・なつ印



試験従事者一覧

濃度設定試験

菌 前 培 養 :
被験物質処理 :
計 数 :



本 試 験

菌 前 培 養 :
被験物質処理 :
計 数 :



要 約

ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* TA100、TA98、TA1535、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いて、ピグメントエロー-14 における突然変異誘発能の有無を検討した。

1. 沈殿/結晶

非代謝活性化法においては 19.5µg/plate 以上、代謝活性化法においては 78.1µg/plate 以上の被験物質処理群において結晶の析出が認められた。

2. 生育阻害

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、全被験物質処理群において試験菌株に対する生育阻害は認められなかった。

3. 復帰変異コロニー

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、溶媒対照と比較して 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。

以上の結果より、本試験条件下におけるピグメントエロー-14 の復帰突然変異誘発能は陰性と判定した。

緒 言

経済産業省 製品評価技術センターの依頼により、ピグメントエロー-14 の安全性試験の一環として、細菌を用いた復帰突然変異試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準及びガイドラインに準拠して実施した。

GLP

- ・ “OECD Principles of Good Laboratory Practice” (as revised in 1997)

毒性試験ガイドライン

- ・ “OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471, Bacterial Reverse Mutation Test”(1997)

試験材料及び方法

1. 被験物質及び対照物質

1-1. 被験物質及び媒体

1-1-1. 被験物質

供給者 : XXXXXXXXXX
被験物質名 : ピグメントエロー-14
(別名: ベンジジンエロー)
CAS 番号 : 5468-75-7
ロット番号 : XXXXXXXXXX
性 状 : やまぶき色粉末
安 定 性 : 冷暗所で安定
保 存 方 法 : 冷暗所 (冷蔵庫内)
保 存 場 所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び変異原性試験室
返 却 : 試験終了後の残量はすべて試験委託者に返却した。

1-1-2. 媒体

名 称 : ジメチルスルホキシド (DMSO)
ロット番号 : ELK6015
製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
保 存 方 法 : 室温
保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

1-2. 被験液の調製

調 製 方 法 : 濃度設定試験は、無菌的操作によりピグメントエロー-14 を採取し、50mg/mL(最少グルコース寒天平板培地シャーレに添加した際の最終濃度: 5000 μ g/plate)を最高用量として DMSO により溶解し、以下公比 4 で 7 段階希釈した計 8 濃度 (①0.00305、②0.0122、③0.0488、④0.195、⑤0.781、⑥3.13、⑦12.5 及び⑧50.0mg/mL) を調製した。

本試験は、50mg/mL(最少グルコース寒天平板培地シャーレに添加

した際の最終濃度：5000 μ g/plate)を最高用量として DMSO により溶解し、以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 濃度(①1.56、②3.13、③6.25、④12.5、⑤25.0 及び⑥50.0mg/mL)を調製した。

保 存 方 法 : 被験液は用時調製とし保存しなかった。

安 定 性 : ピグメントエロー-14 に DMSO を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等は認められなかった。

1-3. 対照物質

1) 溶媒対照(陰性対照)

名 称 : DMSO

ロット番号 : ELK6015

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

保 存 方 法 : 室温

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

2) 陽性対照

名 称 : AF-2 (2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide)

ロット番号 : PAE1151

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

保 存 方 法 : 室温、遮光

名 称 : SAZ (Sodium azide)

ロット番号 : ELP2778

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

保 存 方 法 : 室温、遮光

名 称 : ICR-191 (2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino] acridine · 2HCl)

ロット番号 : 465901

製 造 元 : Polysciences, Inc.

保 存 方 法 : 冷蔵

名 称 : 2AA (2-aminoanthracene)

ロット番号 : M7K7000

製 造 元 : ナカライテスク

保 存 方 法 : 冷蔵

名 称 : B[a]P (Benzo[a]pyrene)

ロット番号 : M5K8326

製 造 元 : ナカライテスク

保 存 方 法 : 室温、遮光

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

(1) 調製方法

以下の処理濃度となるように、AF-2、ICR-191、2AA、B[a]P は DMSO（和光純薬工業株式会社、試薬特級、Lot No. : ELK6015）、SAZ は、注射用水（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、Lot No. : 9K85N）により溶解し、目的濃度に調製した。

対象菌株	陽性対照物質（処理量 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ）	
	非代謝活性化（-S9）	代謝活性化（+S9）
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	AF-2 (0.01)	B[a]P (5.0)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	AF-2 (0.1)	B[a]P (5.0)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	SAZ (0.5)	2AA (2.0)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	ICR-191 (1.0)	B[a]P (5.0)
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2 (0.01)	2AA (10.0)

(2) 陽性対照物質の選択理由

遺伝毒性試験のガイドラインに準じて選択した。

2. 使用菌株

1) 供試菌株

次の5種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

Salmonella typhimurium TA100

Salmonella typhimurium TA1535

Escherichia coli WP2 *uvrA*

フレームシフト型

Salmonella typhimurium TA98

Salmonella typhimurium TA1537

2) 入手先及び入手年月日

<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	:	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
		1997年10月9日 入手
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	:	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
		1997年10月9日 入手
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	:	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
		1997年10月9日 入手
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	:	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
		1997年10月9日 入手
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	:	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
		1997年10月9日 入手

3) 菌株の選択理由

遺伝毒性試験のガイドラインに準じて選択した。当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている。

4) 菌株の保存

菌懸濁液 0.8mL に対して DMSO 0.07mL の割合で加え、分注後-80℃にて保存した。

3. 試 薬

1) S9

名 称 : S9 (Cofactor A set)

ロット番号 : 00092907

製 造 元 : オリエンタル酵母工業株式会社

製造日 : 2000年 9月 29日
 購入日 : 2000年 10月 20日
 種・系統 : ラット・SD系
 性 : 雄
 週齢 : 7週齢
 体重 : 218.0±9.6 g
 誘導物質 : フェノバルビタール (PB) & 5,6-ベンゾフラボン (BF)
 投与方法 : 腹腔内投与

投与期間及び投与量

: PB 4日間 30+60+60+60mg/kg body weight
 : BF 1日間 80mg/kg body weight

保存方法 : 冷凍保存 (約-80℃)

保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

2) Cofactor

名称 : Cofactor (Cofactor A set)
 ロット番号 : A00100207
 製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
 保存方法 : 冷凍保存 (約-80℃)
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

3) S9 mix の組成

S9	1 mL		
Cofactor	9 mL	0.4M 塩化マグネシウム水溶液	0.2 mL
		1.65M 塩化カリウム水溶液	0.2 mL
		1.0M グルコース-6-リン酸水溶液	0.05 mL
		0.1M 還元型ニコチンアミド-アデニン	
		ジヌクレオチドリ酸(NADPH)水溶液	0.4 mL
		0.1M 還元型ニコチンアミド-アデニン	
		ジヌクレオチド(NADH)水溶液	0.4 mL
		0.2M ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	5.0 mL
		精製水	2.75 mL

4) トップアガー

名 称 : BACTO-AGAR
 ロット番号 : 108481JA
 製 造 元 : DIFCO LABORATORIES
 保 存 方 法 : 室温
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

5) 最少グルコース寒天平板培地

名 称 : 最少グルコース寒天培地 BZ
 ロット番号 : BZ030KP
 製 造 元 : オリエンタル酵母工業株式会社
 保 存 方 法 : 15～25℃
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

4. 試験方法¹⁻⁵⁾

4-1. 識別方法

1) 菌株の識別

<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	青
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	緑
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	桃
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	赤
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	黄

2) 濃度の識別

溶媒対照を「SC」(Solvent Control)、陽性対照を「PC」(Positive Control)とし、被験物質処理群の濃度の低い方から「1」「2」「3」「4」「5」「6」…と番号をつけた。なお、非代謝活性化は「-」、代謝活性化は「+」をそれぞれ番号の前につけた。

4-2. 前培養条件

1) ニュートリエントブロス

名 称 : Nutrient Broth No.2

ロット番号 : 59365
 製造元 : OXOID
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

2) 振盪培養装置

型式 : BIOSPIN MBS-1
 製造元 : 東京理化器械株式会社(EYELA)

3) 前培養方法

無菌的操作により培養用三角フラスコにニュートリエントブロス 30mL を分注し、以下に示す凍結保存菌懸濁液を接種した。

Salmonella typhimurium TA 株 : 60 μ L

Escherichia coli 株 : 30 μ L

これを 37℃ で約 8 時間前培養した後に吸光度を測定し、この吸光度から換算した理論生菌数が 1×10^9 個/mL 以上の菌濃度であることを確認し供試菌懸濁液とした。なお、菌懸濁液は使用まで急激な温度変化を避け室温にて放置した。

前培養終了後に測定した O.D. 値より換算した生菌数

菌株	濃度設定試験	本試験
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	2.17×10^9 /mL	2.21×10^9 /mL
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	2.48×10^9 /mL	2.26×10^9 /mL
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	2.63×10^9 /mL	2.96×10^9 /mL
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	2.85×10^9 /mL	2.90×10^9 /mL
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	3.71×10^9 /mL	3.39×10^9 /mL

4-3. 濃度設定試験

被験物質の 5000 μ g/plate を最高用量とし、以下公比 4 で希釈した計 8 濃度(0.305、1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250 及び 5000 μ g/plate)の濃度設定試験を実施し、その結果を基に本試験における用量段階を設定した。

操作は、被験液 0.1mL に非代謝活性化においては 0.1M ナトリウムーリン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5mL、代謝活性化においては S9 mix 0.5mL を加え、さらに各菌懸濁液 0.1mL を

加えた。37℃で20分間振盪し(ブレインキュベーション)、これにトップアガーを2.0mL加えた後に最少グルコース寒天平板培地に重層した。37℃で48時間培養した後、試験菌株の生育阻害及び沈殿/結晶の析出の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。この結果、非代謝活性化法においては19.5µg/plate以上、代謝活性化法においては78.1µg/plate以上の寒天培地シャーレに結晶の析出が認められたため、被験物質処理群の復帰変異コロニー数はマニュアルカウンターを用いて肉眼により計数した。陽性対照群のシャーレについてはコロニーカウンター(バイオマルチスキャナーBMS-400、東洋測器)を用いて計数した。また、溶媒対照群についてはこれら両カウンターを用いて計数を行い、コロニーカウンターによる計数値が肉眼による計数値と近似していることを確認した上で、肉眼による計数値を採用した。

なお、トップアガーは、*Salmonella typhimurium* TA株を用いる場合は0.5mM D-ビオチン-0.5mM ヒスチジン溶液を1/10容、また *Escherichia coli* 株を用いる場合には0.5mM L-トリプトファン溶液を同割合で軟寒天液(0.6% Agar、0.6% NaCl)に加えたものを用いた。また、最少グルコース寒天平板培地は各用量につき3 plate 設けた。

4-4. 本試験

濃度設定試験の結果、全被験物質処理群において試験菌株に対する生育阻害が認められなかったため、5000µg/plateを最高用量とし、以下公比2で5段階希釈した計6濃度(156、313、625、1250、2500及び5000µg/plate)の用量について本試験を実施した。なお、試験操作は濃度設定試験と同条件とし、濃度設定試験結果と本試験結果の判定の再現性を確認した。

4-5. 追加確認試験

追加確認試験の必要性が認められなかったため実施しなかった。

5. 判定基準

結果の判定は、被験物質処理における復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数に対して顕著に増加し(溶媒対照の2倍を目安とした)、この増加に用量反応性が認められ、また濃度設定試験・本試験の各判定に再現性が認められた場合に陽性と判定した。なお、判定に際しては統計学的処理は行わなかった。

試験結果

1. 濃度設定試験

濃度設定試験の結果を Table 1, 2 及び Figure 1~5（上段）に示した。

1) 培養終了前後の観察結果

被験物質重層処理直後の肉眼による寒天培地シャーレの観察の結果、非代謝活性化法においては 78.1 μ g/plate 以上、代謝活性化法においては 313 μ g/plate 以上の被験物質処理群に結晶の析出が認められた。また、培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察では、非代謝活性化法の 19.5 μ g/plate、代謝活性化法の 78.1 μ g/plate においても結晶の析出が認められた。さらに、培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察では、菌株及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群において、試験菌株に対する生育阻害は認められなかった。

2) 復帰変異コロニー数

被験物質を処理した全用量群について、溶媒対照と比較して 2 倍以上及び用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

3) 試験系の成立条件

陽性対照群では各菌株の溶媒対照に比較して 2 倍以上の復帰変異コロニーが認められた。

全ての用量群について 3 枚のシャーレによる復帰変異コロニー数に顕著な差は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかった。

各菌株の代謝活性化の存在下及び非存在下における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は試験実施施設における背景データ (Attached Data 1) との比較において異常と考えられる数値を認めなかった。

2. 本試験

本試験の結果を Table 3, 4 及び Figure 1~5（下段）に示した。

1) 濃度設定理由

濃度設定試験の結果、菌株及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群にお

いて、試験菌株に対する生育阻害が認められなかったため、本試験における被験物質濃度は、濃度設定試験において最高用量として設定した 5000 μ g/plate を最高用量とし、公比 2 で 5 段階希釈した計 6 濃度 (156、313、625、1250、2500 及び 5000 μ g/plate) を設定した。

2) 培養終了前後の観察結果

被験物質重層処理直後の肉眼による寒天培地シャーレの観察の結果、非代謝活性化法においては 156 μ g/plate 以上、代謝活性化法においては 313 μ g/plate 以上の被験物質処理群に結晶の析出が認められた。また、培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察では、代謝活性化の有無にかかわらず、全被験物質処理群において結晶の析出が認められた。さらに、培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察では、菌株及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群において試験菌株に対する生育阻害は認められなかった。

3) 復帰変異コロニー数

被験物質を処理した全用量群について、溶媒対照と比較して 2 倍以上及び用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

4) 試験系の成立条件

陽性対照群では各菌株の溶媒対照に比較して 2 倍以上の復帰変異コロニーが認められた。

全ての用量群について 3 枚のシャーレによる復帰変異コロニー数に顕著な差は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかった。

各菌株の代謝活性化の存在下及び非存在下における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は試験実施施設における背景データ (Attached Data 1) との比較において異常と考えられる数値を認めなかった。

考 察

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、菌株、被験物質濃度及び代謝活性化の有無にかかわらず、溶媒対照と比較して2倍以上及び用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、本被験物質の復帰突然変異誘発能は陰性であることが示唆された。一方、陽性対照群では各菌株の溶媒対照群に比較して2倍以上の明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められたことから、供試菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認された。

更に、各菌株の代謝活性化及び非代謝活性化における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は試験実施施設における背景データとの比較において異常と考えられる数値を認めず、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果より、ピグメントエロー-14 は本試験条件下において復帰突然変異誘発能を有さないと判断した。

参考文献

- 1) Bruce N.Ames, Joyce McCann and Edith Yamasaki.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research. 31.347-364.1975
- 2) Dorothy M.Maroon and Bruce N.Ames.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research. 113.173-215.1983
- 3) 石館基監修、能美健彦、松井道子編集: 微生物を用いる変異原性試験データ集、株式会社エル・アイ・シー、1991
- 4) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集: 厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A、サイエンティスト社、1992
- 5) 日本バイオアッセイ研究センター編集: 微生物を用いる変異原性試験手法解説、富士オフセット株式会社、1999

Attached Data 1

Background Data of the Testing Facility

Background data of Reverse Mutation Tests in Bacteria, based on 10 studies carried out under the same conditions at Bozo Research Center Inc.

		Period: August 2000 – December 2000				
Bacterial Strain	S9	Classification	Mean \pm S.D.	n	Actual ranges	Control ranges
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	–	Solvent control	107 \pm 5.8	60	90 ~ 123	85 ~ 122
		Positive control	878 \pm 63.0	60	757 ~ 1087	654 ~ 993
	+	Solvent control	111 \pm 7.9	60	95 ~ 137	95 ~ 129
		Positive control	886 \pm 64.0	60	710 ~ 987	680 ~ 1070
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	–	Solvent control	23 \pm 1.8	60	17 ~ 28	16 ~ 29
		Positive control	441 \pm 79.8	60	270 ~ 604	345 ~ 853
	+	Solvent control	30 \pm 3.6	60	22 ~ 43	19 ~ 37
		Positive control	253 \pm 19.2	60	207 ~ 295	226 ~ 313
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	–	Solvent control	12 \pm 1.4	60	9 ~ 17	10 ~ 18
		Positive control	299 \pm 44.1	60	193 ~ 372	237 ~ 475
	+	Solvent control	14 \pm 1.5	60	10 ~ 19	10 ~ 19
		Positive control	194 \pm 41.6	60	130 ~ 281	116 ~ 306
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	–	Solvent control	12 \pm 1.5	60	9 ~ 17	10 ~ 17
		Positive control	1932 \pm 145.6	60	1674 ~ 2172	1463 ~ 2175
	+	Solvent control	13 \pm 2.7	60	9 ~ 23	4 ~ 17
		Positive control	90 \pm 6.9	60	76 ~ 106	80 ~ 118
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	–	Solvent control	29 \pm 2.8	60	21 ~ 37	20 ~ 40
		Positive control	166 \pm 27.7	60	116 ~ 234	36 ~ 221
	+	Solvent control	31 \pm 3.1	60	24 ~ 40	18 ~ 40
		Positive control	373 \pm 56.9	60	271 ~ 521	242 ~ 421

Actual ranges: Maximum and minimum of the total colony counts.

Control ranges: Top and low limits of the range of controlled values,

where daily change of the mean colony count in each group was taken into consideration.

S9 : without metabolic activation (–); with metabolic activation (+)

n : Total number of minimum glucose agar plates used.

Solvent controls:

physiological saline, water for injection or dimethylsulfoxide (DMSO)
(solvent used for dissolution, suspension or dilution of the test article)

Positive controls:

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide(dissolved in DMSO)

SAZ : Sodium azide(dissolved in water for injection)

ICR-191 : 2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino] acridine.2HCl(dissolved in DMSO)

2AA : 2-aminoanthracene(dissolved in DMSO)

B[a]P : Benzo[a]pyrene(dissolved in DMSO)

CODE No.: 0029

Table 1 Results of Dose Range Finding Study without Metabolic Activation

±S9 mix	Concentration (µg/plate)	Number of revertant (Number of colonies/plate)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	Solvent Control	101 97 106 (101 ± 4.5)	11 16 12 (13 ± 2.6)	29 24 30 (28 ± 3.2)	21 20 26 (22 ± 3.2)	13 10 11 (11 ± 1.5)	
	0.305	103 116 99 (106 ± 8.9)	15 19 16 (17 ± 2.1)	23 36 20 (26 ± 8.5)	20 23 24 (22 ± 2.1)	13 15 17 (15 ± 2.0)	
	1.22	108 102 97 (102 ± 5.5)	17 15 16 (16 ± 1.0)	21 20 27 (23 ± 3.8)	29 28 22 (26 ± 3.8)	16 18 12 (15 ± 3.1)	
	4.88	97 110 95 (101 ± 8.1)	16 20 16 (17 ± 2.3)	32 22 21 (25 ± 6.1)	26 24 27 (26 ± 1.5)	18 11 10 (13 ± 4.4)	
	19.5	91 a 107 a 97 a (98 ± 8.1)	17 a 19 a 19 a (18 ± 1.2)	24 a 29 a 26 a (26 ± 2.5)	25 a 20 a 29 a (25 ± 4.5)	11 a 19 a 17 a (16 ± 4.2)	
	78.1	99 a 92 a 99 a (97 ± 4.0)	14 a 20 a 17 a (17 ± 3.0)	23 a 29 a 24 a (25 ± 3.2)	22 a 21 a 25 a (23 ± 2.1)	18 a 19 a 16 a (18 ± 1.5)	
	313	104 a 101 a 107 a (104 ± 3.0)	19 a 16 a 14 a (16 ± 2.5)	26 a 21 a 26 a (24 ± 2.9)	29 a 29 a 21 a (26 ± 4.6)	13 a 14 a 18 a (15 ± 2.6)	
	1250	109 a 99 a 105 a (104 ± 5.0)	15 a 11 a 19 a (15 ± 4.0)	31 a 27 a 32 a (30 ± 2.6)	26 a 24 a 22 a (24 ± 2.0)	19 a 13 a 14 a (15 ± 3.2)	
	5000	97 a 107 a 93 a (99 ± 7.2)	15 a 14 a 21 a (17 ± 3.8)	32 a 25 a 29 a (29 ± 3.5)	27 a 25 a 24 a (25 ± 1.5)	14 a 12 a 13 a (13 ± 1.0)	
	Name	AF-2 ^{#1}	SAZ ^{#2}	AF-2	AF-2	ICR-191 ^{#3}	
	Concentration	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00	
	Number of colonies/plate	794 894 887 (858 ± 55.8)	289 297 310 (299 ± 10.6)	156 161 162 (160 ± 3.2)	313 318 301 (311 ± 8.7)	1964 1822 1853 (1880 ± 74.7)	

Solvent Control: DMSO

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, #2: Sodium azide

#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine.2HCl

(): Mean of 3 plates ± Standard deviation

Growth inhibition of tester strains was not seen at any dose levels.

a: Deposition of crystals was seen.

Table 2 Results of Dose Range Finding Study with Metabolic Activation

±S9 mix	Concentration (µg/plate)	Number of revertant(Number of colonies/plate)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 mix (+)	Solvent Control	120	13	28	29	11	
		103	11	34	29	13	
		108 (110 ± 8.7)	12 (12 ± 1.0)	34 (32 ± 3.5)	24 (27 ± 2.9)	19 (14 ± 4.2)	
	0.305	97	15	34	29	13	
		97	11	33	24	12	
		91 (95 ± 3.5)	13 (13 ± 2.0)	31 (33 ± 1.5)	26 (26 ± 2.5)	10 (12 ± 1.5)	
	1.22	110	15	32	27	15	
		92	18	33	21	12	
		111 (104 ± 10.7)	19 (17 ± 2.1)	28 (31 ± 2.6)	24 (24 ± 3.0)	14 (14 ± 1.5)	
	4.88	119	12	30	37	16	
		109	17	35	21	18	
		103 (110 ± 8.1)	15 (15 ± 2.5)	27 (31 ± 4.0)	22 (27 ± 9.0)	13 (16 ± 2.5)	
	19.5	104	11	28	29	12	
		112	15	33	33	10	
		116 (111 ± 6.1)	19 (15 ± 4.0)	30 (30 ± 2.5)	28 (30 ± 2.6)	12 (11 ± 1.2)	
	78.1	111 a	15 a	36 a	26 a	19 a	
		102 a	11 a	36 a	35 a	18 a	
		98 a (104 ± 6.7)	17 a (14 ± 3.1)	35 a (36 ± 0.6)	34 a (32 ± 4.9)	20 a (19 ± 1.0)	
	313	118 a	15 a	36 a	31 a	13 a	
		111 a	12 a	29 a	36 a	10 a	
		115 a (115 ± 3.5)	13 a (13 ± 1.5)	29 a (31 ± 4.0)	28 a (32 ± 4.0)	11 a (11 ± 1.5)	
	1250	118 a	17 a	32 a	24 a	11 a	
		111 a	11 a	29 a	19 a	18 a	
		106 a (112 ± 6.0)	19 a (16 ± 4.2)	36 a (32 ± 3.5)	27 a (23 ± 4.0)	15 a (15 ± 3.5)	
	5000	114 a	18 a	26 a	32 a	18 a	
		104 a	15 a	23 a	31 a	18 a	
		116 a (111 ± 6.4)	18 a (17 ± 1.7)	32 a (27 ± 4.6)	25 a (29 ± 3.8)	11 a (16 ± 4.0)	
	Name	B[a]P ^{#4}	2AA ^{#5}	2AA	B[a]P	B[a]P	
	Concentration	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00	
	Number of colonies/plate	825	205	329	301	82	
		811	210	293	246	93	
		825 (820 ± 8.1)	200 (205 ± 5.0)	303 (308 ± 18.6)	269 (272 ± 27.6)	88 (88 ± 5.5)	

Solvent Control: DMSO

#4: Benzo[a]pyrene, #5: 2-Aminoanthracene

(): Mean of 3 plates ± Standard deviation

Growth inhibition of tester strains was not seen at any dose levels.

a: Deposition of crystals was seen.

Table 3 Results of Main Study without Metabolic Activation

±S9 mix	Concentration (µg/plate)	Number of revertant(Number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (—)	Solvent Control	100	11	32	26	16
		104	13	27	21	11
		109 (104 ± 4.5)	14 (13 ± 1.5)	26 (28 ± 3.2)	21 (23 ± 2.9)	13 (13 ± 2.5)
	156	103 a	18 a	28 a	28 a	15 a
		117 a	17 a	22 a	22 a	14 a
		115 a (112 ± 7.6)	19 a (18 ± 1.0)	25 a (25 ± 3.0)	28 a (26 ± 3.5)	19 a (16 ± 2.6)
	313	124 a	12 a	26 a	22 a	14 a
		102 a	16 a	28 a	21 a	13 a
		124 a (117 ± 12.7)	13 a (14 ± 2.1)	29 a (28 ± 1.5)	21 a (21 ± 0.6)	13 a (13 ± 0.6)
	625	104 a	16 a	22 a	22 a	12 a
		99 a	17 a	34 a	23 a	13 a
		106 a (103 ± 3.6)	12 a (15 ± 2.6)	26 a (27 ± 6.1)	27 a (24 ± 2.6)	16 a (14 ± 2.1)
	1250	93 a	17 a	30 a	19 a	16 a
		115 a	17 a	28 a	27 a	11 a
		95 a (101 ± 12.2)	11 a (15 ± 3.5)	28 a (29 ± 1.2)	24 a (23 ± 4.0)	12 a (13 ± 2.6)
	2500	96 a	15 a	29 a	19 a	16 a
		96 a	11 a	28 a	20 a	11 a
		102 a (98 ± 3.5)	18 a (15 ± 3.5)	23 a (27 ± 3.2)	20 a (20 ± 0.6)	14 a (14 ± 2.5)
	5000	124 a	16 a	23 a	20 a	15 a
		91 a	10 a	21 a	22 a	11 a
		101 a (105 ± 16.9)	11 a (12 ± 3.2)	23 a (22 ± 1.2)	27 a (23 ± 3.6)	11 a (12 ± 2.3)
Name	AF-2 ^{#1}	SAZ ^{#2}	AF-2	AF-2	ICR-191 ^{#3}	
Concentration	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00	
Number of colonies/plate	783	351	164	539	2119	
	825	350	177	553	2088	
	783 (797 ± 24.2)	351 (351 ± 0.6)	169 (170 ± 6.6)	563 (552 ± 12.1)	2027 (2078 ± 46.8)	

Solvent Control: DMSO

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, #2: Sodium azide

#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine.2HCl

(): Mean of 3 plates ± Standard deviation

Growth inhibition of tester strains was not seen at any dose levels.

a: Deposition of crystals was seen.

Table 4 Results of Main Study with Metabolic Activation

±S9 mix	Concentration (µg/plate)	Number of revertant(Number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Solvent Control	121 124 115 (120 ± 4.6)	16 12 11 (13 ± 2.6)	32 29 31 (31 ± 1.5)	33 25 27 (28 ± 4.2)	11 15 16 (14 ± 2.6)
	156	96 a 95 a 98 a (96 ± 1.5)	10 a 15 a 16 a (14 ± 3.2)	26 a 29 a 32 a (29 ± 3.0)	26 a 37 a 23 a (29 ± 7.4)	11 a 14 a 14 a (13 ± 1.7)
	313	119 a 97 a 115 a (110 ± 11.7)	10 a 12 a 12 a (11 ± 1.2)	33 a 23 a 22 a (26 ± 6.1)	24 a 34 a 29 a (29 ± 5.0)	13 a 13 a 11 a (12 ± 1.2)
	625	106 a 129 a 106 a (114 ± 13.3)	10 a 18 a 12 a (13 ± 4.2)	29 a 24 a 22 a (25 ± 3.6)	28 a 20 a 27 a (25 ± 4.4)	10 a 15 a 14 a (13 ± 2.6)
	1250	93 a 101 a 116 a (103 ± 11.7)	13 a 11 a 18 a (14 ± 3.6)	29 a 28 a 32 a (30 ± 2.1)	29 a 23 a 29 a (27 ± 3.5)	11 a 9 a 8 a (9 ± 1.5)
	2500	105 a 98 a 102 a (102 ± 3.5)	18 a 18 a 18 a (18 ± 0.0)	24 a 26 a 35 a (28 ± 5.9)	23 a 25 a 24 a (24 ± 1.0)	15 a 11 a 13 a (13 ± 2.0)
	5000	110 a 106 a 125 a (114 ± 10.0)	12 a 14 a 9 a (12 ± 2.5)	32 a 32 a 27 a (30 ± 2.9)	30 a 23 a 24 a (26 ± 3.8)	16 a 10 a 12 a (13 ± 3.1)
	Name	B[a]P ^{#4}	2AA ^{#5}	2AA	B[a]P	B[a]P
	Concentration	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of colonies/plate	971 983 971 (975 ± 6.9)	181 182 186 (183 ± 2.6)	400 364 372 (379 ± 18.9)	313 309 315 (312 ± 3.1)	93 96 97 (95 ± 2.1)

Solvent Control: DMSO

#4: Benzo[a]pyrene , #5: 2-Aminoanthracene

(): Mean of 3 plates ± Standard deviation

Growth inhibition of tester strains was not seen at any dose levels.

a: Deposition of crystals was seen.

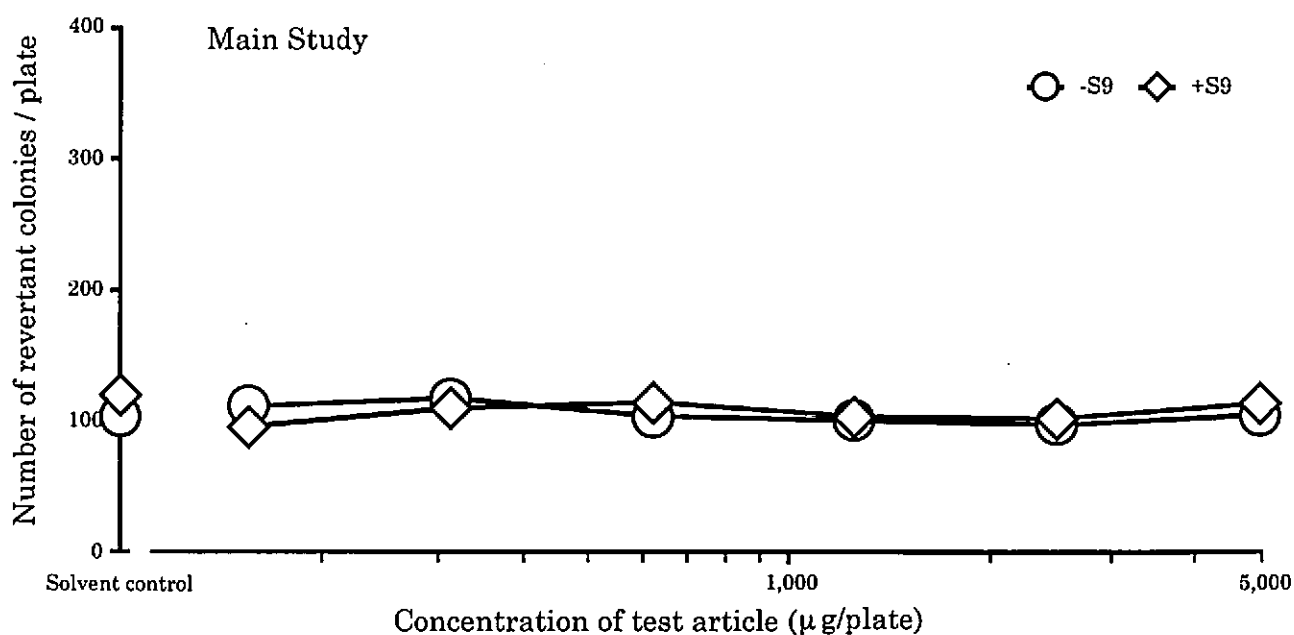
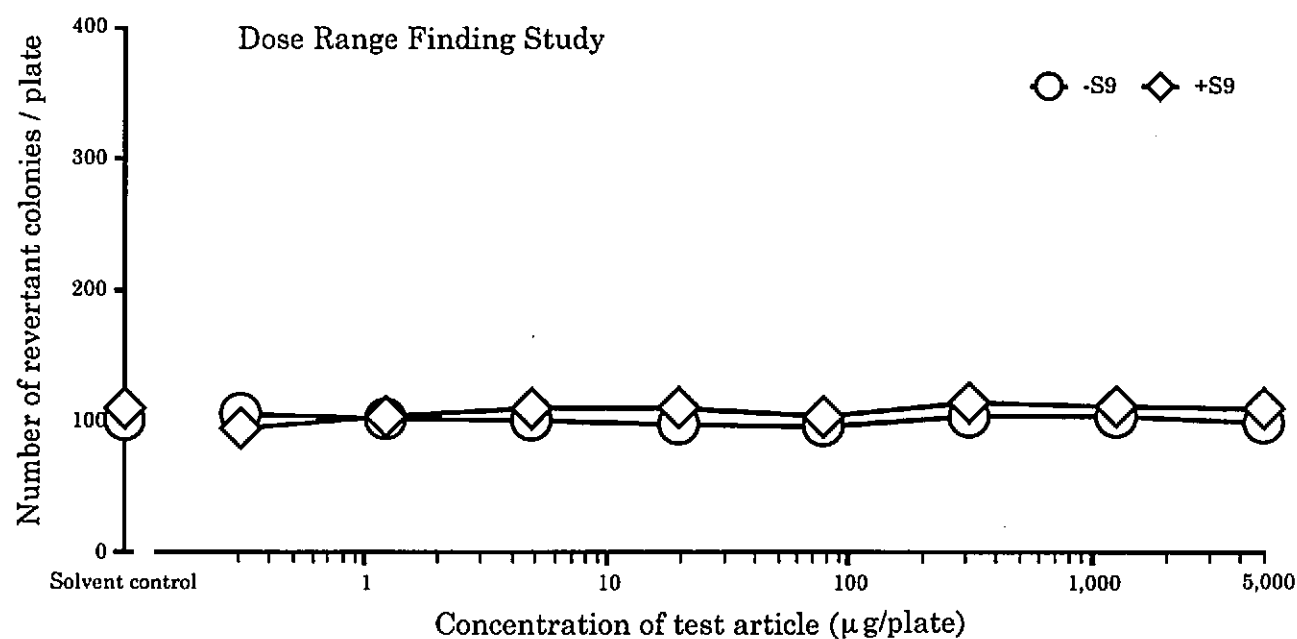


Figure 1

Concentrations and Number of Revertant Colonies
in *Salmonella typhimurium* TA100

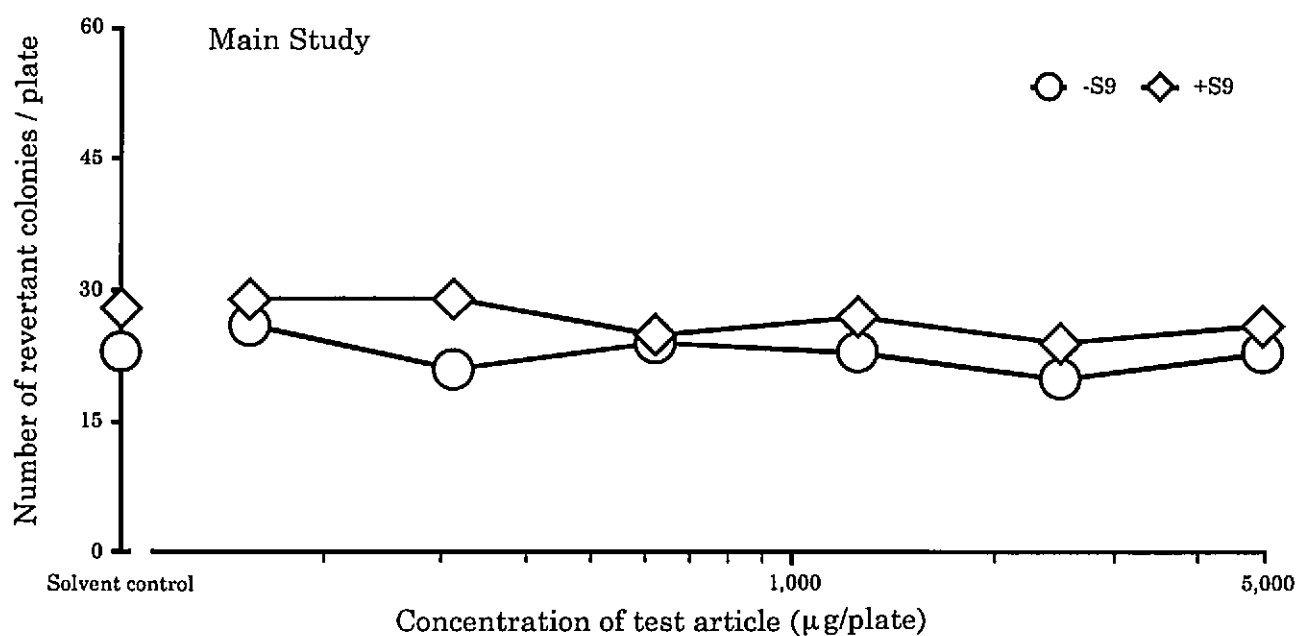
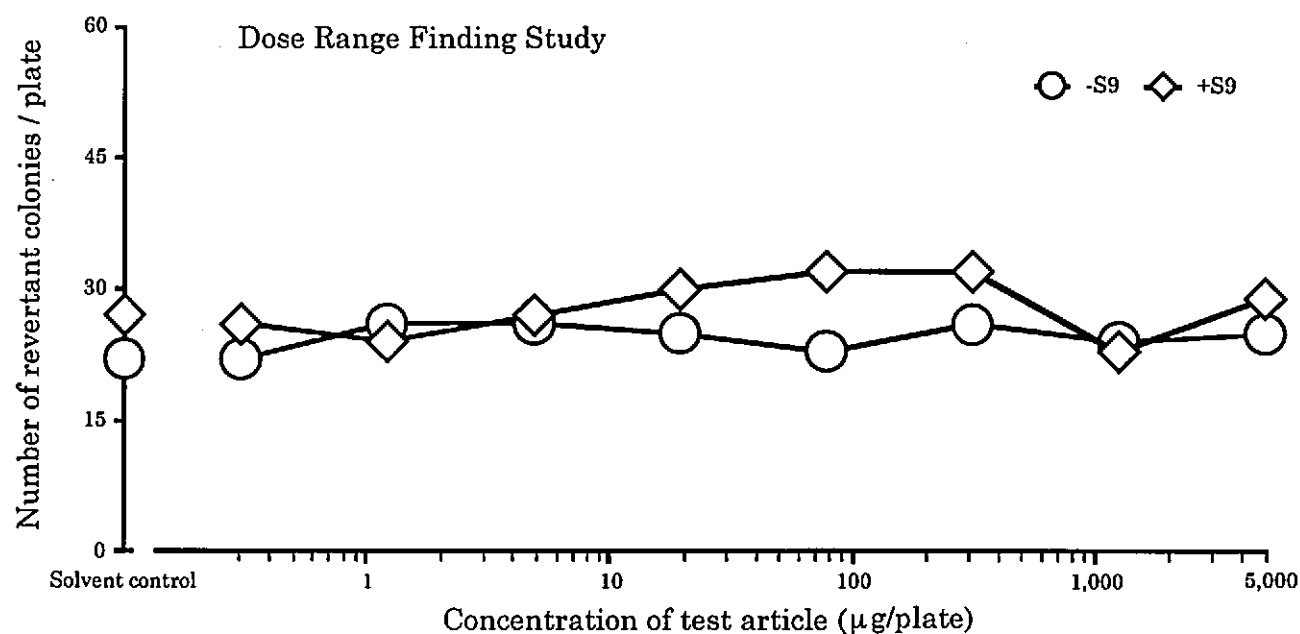


Figure 2

Concentrations and Number of Revertant Colonies
in *Salmonella typhimurium* TA98

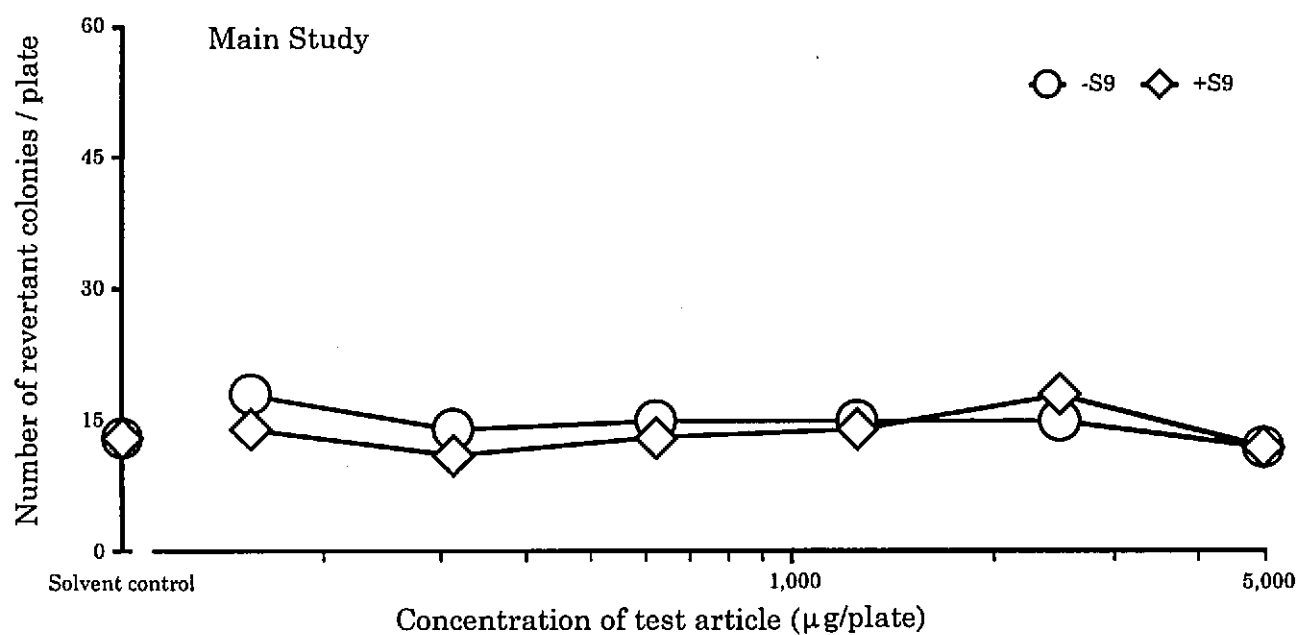
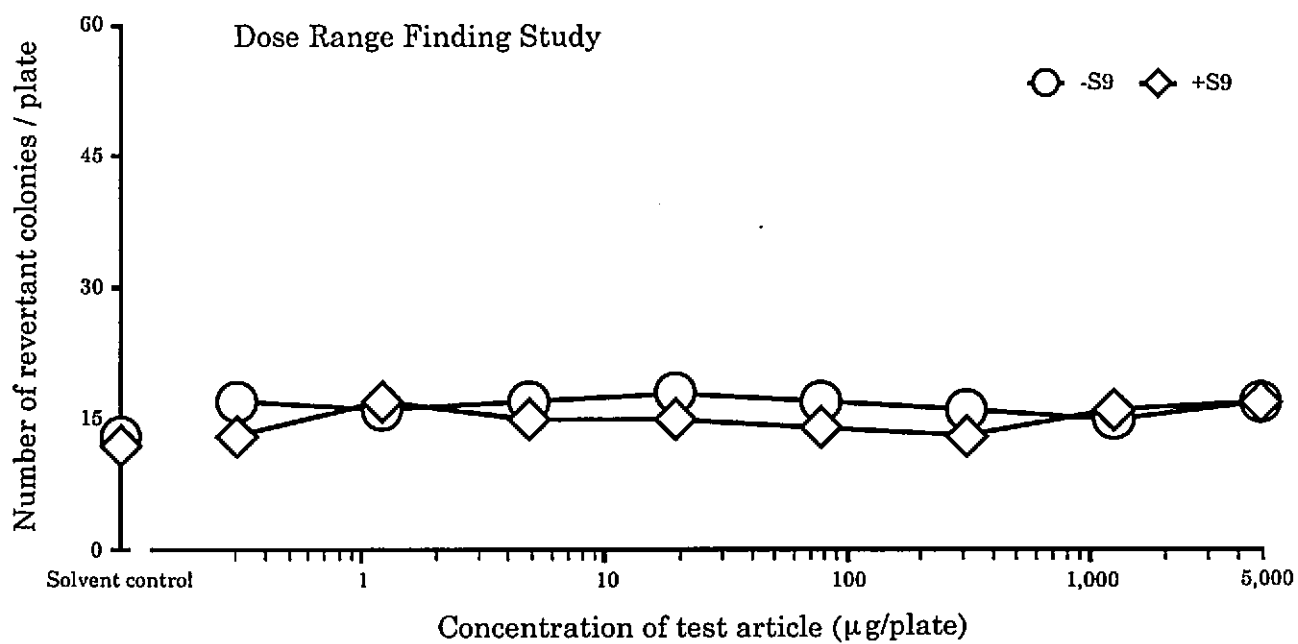


Figure 3

Concentrations and Number of Revertant Colonies
in *Salmonella typhimurium* TA1535

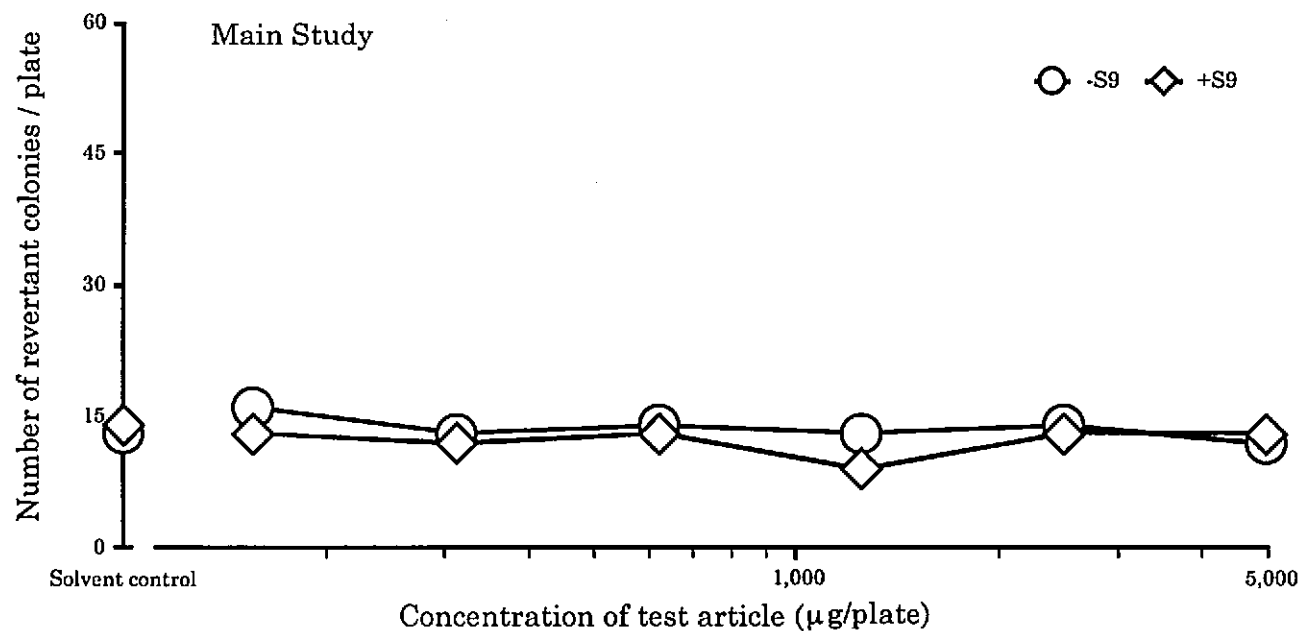
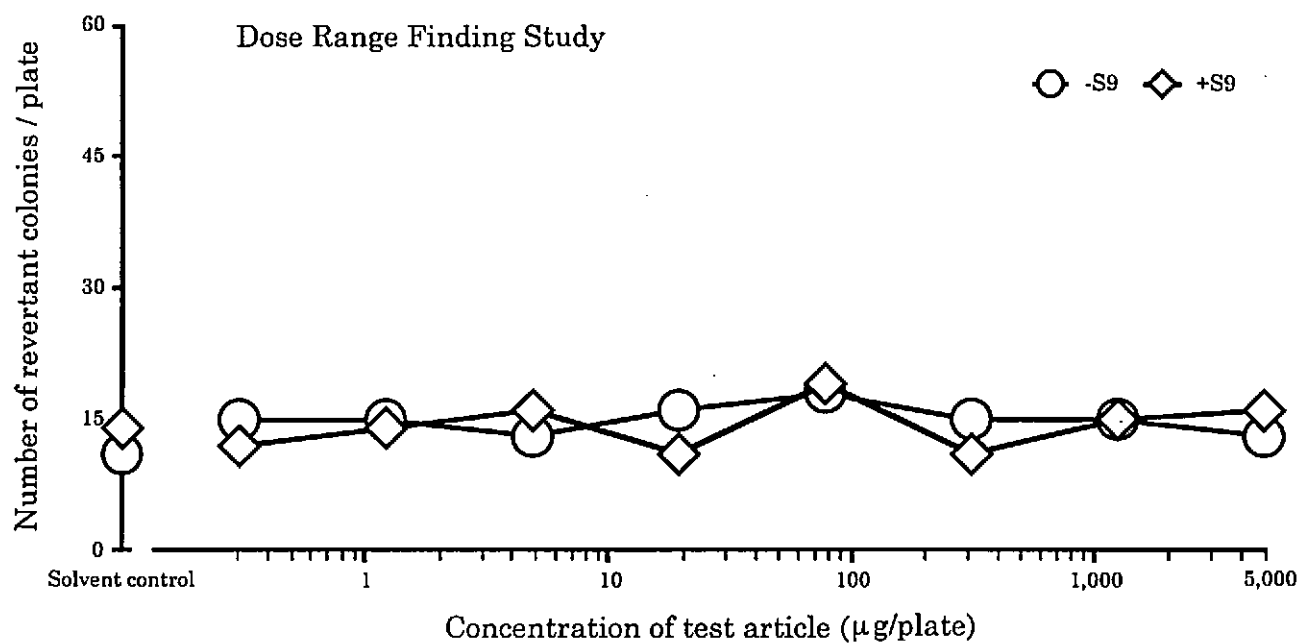


Figure 4

Concentrations and Number of Revertant Colonies
in *Salmonella typhimurium* TA1537

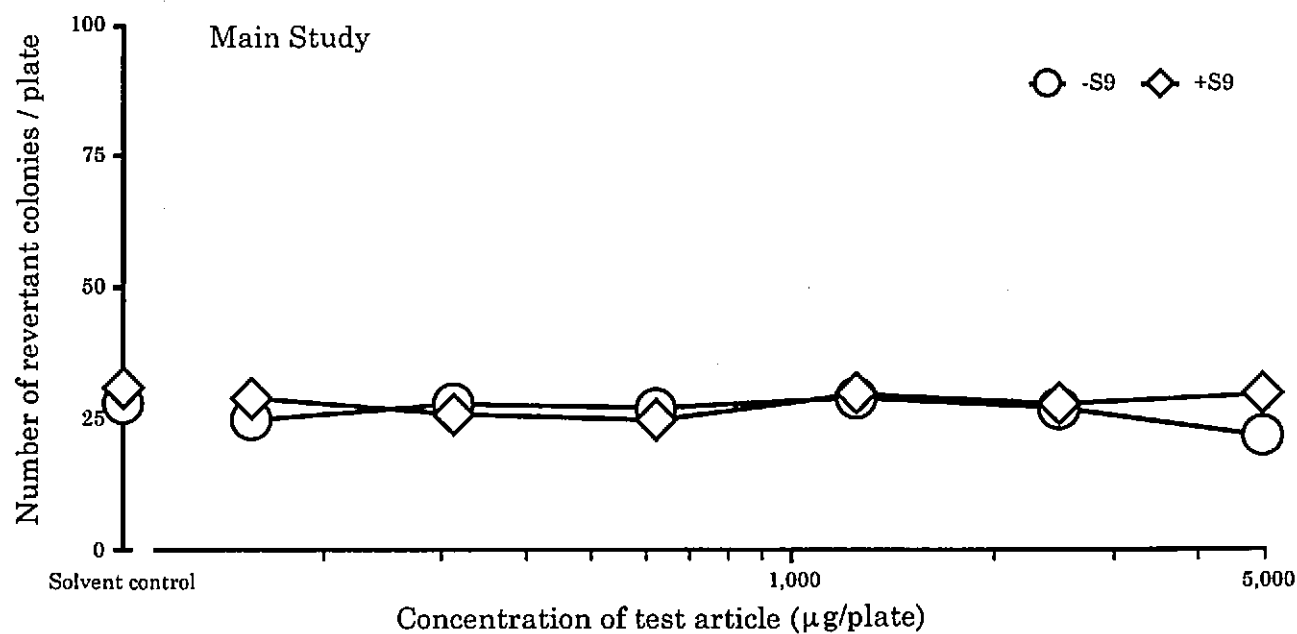
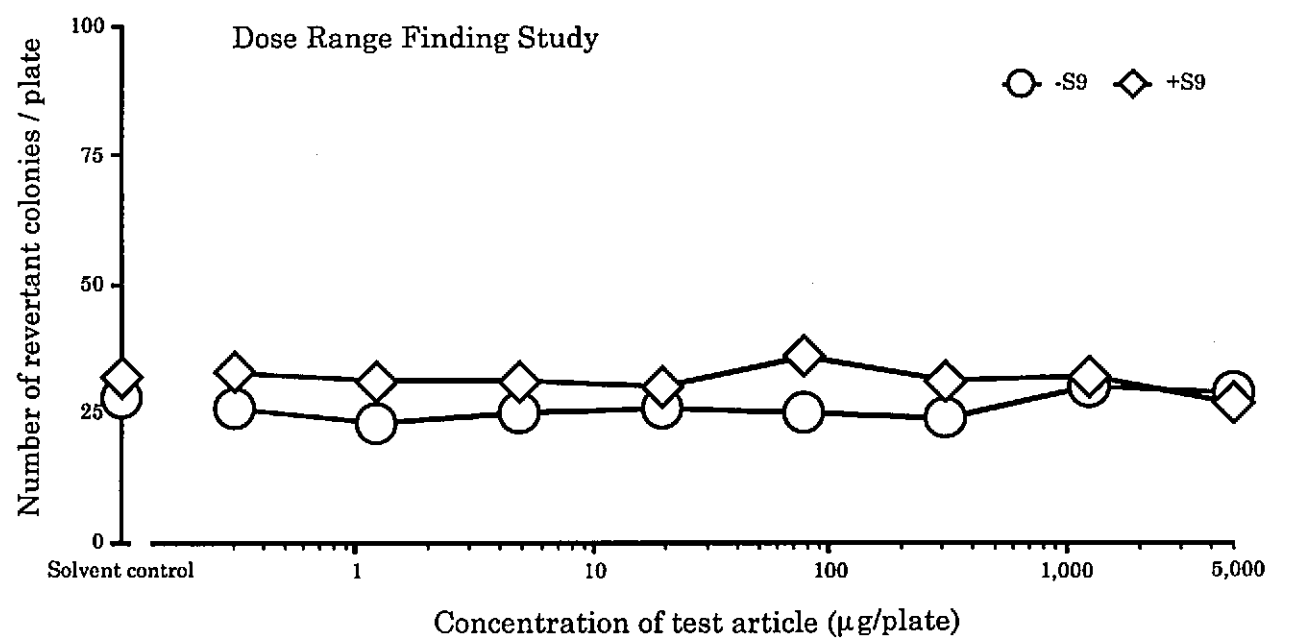
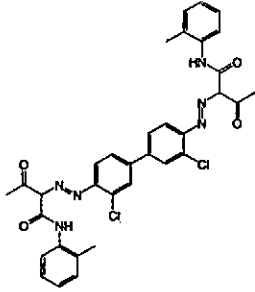


Figure 5

Concentrations and Number of Revertant Colonies
in *Escherichia coli* WP2 *uvrA*

細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的事項

被験物質の名称	ピグメントエロー-14					
別名	ベンジジンエロー					
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)	 $C_{34}H_{30}Cl_2N_6O_4$					
試験に供した被験物質の純度	不明		試験に供した被験物質の Lot No.		[REDACTED]	
不純物の名称及び濃度	不明 (乾燥減量: 0.36wt%、強熱残分: 11.8 wt%)					
C A S 番号	5468-75-7		蒸気圧		-	
分子量	657.55		分配係数		-	
融点	- °C		常温における性状		やまぶき色粉末	
沸点	- °C					
安定性	冷暗所で安定					
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	-	-	DMSO	-	-
	アセトン	-	-	その他 ()	-	-

〔備考〕物理化学的性状は参考資料であるので、可能な限り記入すること。

1. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
2. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
3. 「分配係数」の欄には、分配係数、測定温度及び分配係数の測定に用いた溶媒名を記入すること。
4. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 試験に用いた菌株

菌 株 名	入 手 先	入手年月日
<i>S.typhimurium</i> TA100	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
<i>S.typhimurium</i> TA98	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
<i>S.typhimurium</i> TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
<i>S.typhimurium</i> TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日

3. S9 mix

(1) S9の入手方法等（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

自 製 ・ 購 入 の 別	1. 自 製 (2). 購 入 (製造元 オリエンタル酵母工業株式会社)
製 造 年 月 日	2000 年 9 月 29 日 製造 (S9) 2000 年 10 月 2 日 製造 (コファクターA)
購入の場合の Lot No.	00092907 (S9) A00100207 (コファクターA)
保 存 温 度	約 -80℃

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD 系	名 称	・フェバ'ル'タル ・5,6-ベン'ゾ'フラボン
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週 令	7 週	投与期間及び投与量 (g / k g 体重)	・フェバ'ル'タル 4 日間: 0.03+0.06+0.06+0.06 ・5,6-ベン'ゾ'フラボン 1 日間: 0.08
体 重	218.0±9.6 g		

(3) S9 mixの組成

成 分	S9 mix 1ml 中の量	成 分	S9 mix 1ml 中の量
S 9	0.1 ml	NADPH	4.0 μmol
MgCl ₂	8.0 μmol	NADH	4.0 μmol
KCl	33.0 μmol	Na-リン酸緩衝液	100.0 μmol
グルコース-6-リン酸	5.0 μmol	その他 ()	-

自 製 ・ 購 入 の 別	① 自 製 ② 購 入 (製造元 利エンル酵母工業株式会社)
製 造 年 月 日	2000 年 11 月 14 日製造
購 入 の 場 合 の L o t N o .	BZ030KP
使用寒天の名称・製造元・Lot No.	最少ゲル-ス寒天培地 BZ、利エンル酵母工業株式会社、BZ030KP

採用した試験方法	① プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他 ()
その他の場合は その選定理由	—

組 成	菌 懸 濁 液	0.10 ml
	被 験 物 質 溶 液	0.10 ml
	Na-リン酸緩衝液（直接法による場合）	0.50 ml
	S9 mix（代謝活性化法による場合）	0.50 ml
	ト ッ プ ア ガ ー	2.0 ml
	そ の 他（ ）	—
ブレインキュベーション	温 度	37.0 ℃
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37.0 ℃
	時 間	48 時間

計測方法	①. マニュアル計測 ②. 機器計測 (被験物質処理群に結晶が析出した為陽性対照群のみ適用した)
補正の有無	①. 無 ②. 有 (補正の方法 面積補正)

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

9. 試験の結果

(1) 試験の結果は別表 1 による。

(2) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと。)	陽性	陰性
<p>判定の理由</p> <p>用量設定試験及び本試験のいずれにおいても、菌株、被験物質濃度及び代謝活性化の有無にかかわらず、陰性対照と比較して 2 倍以上及び用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、本被験物質の復帰突然変異誘発能は陰性であることが示唆された。一方、陽性対照群では各菌株の陰性対照群に比較して 2 倍以上の復帰変異コロニーが認められたことから、供試菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認された。</p> <p>以上の結果により、ピグメントエロー-14 の復帰突然変異誘発能は陰性であると判定した。</p>		

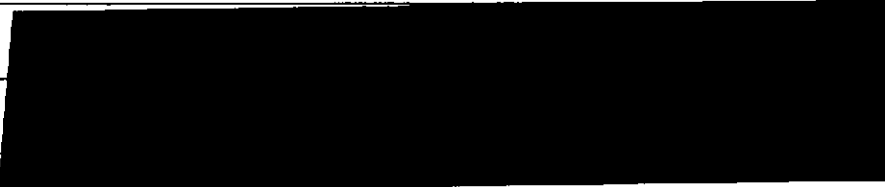

(陽性と判定した場合には、別表 2 比活性の表を添付すること。)

(3) 参考事項

特筆事項無し

〔備考〕 「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

10. その他

試験実施施設	名 称	株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所	
	所 在 地	静岡県御殿場市かまど 1284	電話 0550(82)2000 FAX 0550(82)2379
試験実施期間 中の試験責任 者	職 氏 名		
	経験年数		
試験終了後の 試験責任者	職 氏 名		
試験番号	M-1097		
試験期間	2000 年 12 月 6 日 より 2001 年 6 月 14 日		

【備考】

1. 本様式への記載は最終報告書より転記して作成すること。
2. 最終報告書と同じ試験番号を記入すること。

(別表1)

試 験 結 果 表

被験物質の名称：ピグメントエロー-14 用量設定試験

試験実施期間		2001年1月17日 より 2001年1月19日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		<i>S. typhimurium</i> TA100	<i>S. typhimurium</i> TA1535	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S. typhimurium</i> TA98	<i>S. typhimurium</i> TA1537
-S9 mix	陰性対照	101 97 (101) 106	11 16 (13) 12	29 24 (28) 30	21 20 (22) 26	13 10 (11) 11
	0.305	103 116 (106) 99	15 19 (17) 16	23 36 (26) 20	20 23 (22) 24	13 15 (15) 17
	1.22	108 102 (102) 97	17 15 (16) 16	21 20 (23) 27	29 28 (26) 22	16 18 (15) 12
	4.88	97 110 (101) 95	16 20 (17) 16	32 22 (25) 21	26 24 (26) 27	18 11 (13) 10
	19.5 †	91 107 (98) 97	17 19 (18) 19	24 29 (26) 26	25 20 (25) 29	11 19 (16) 17
	78.1 †	99 92 (97) 99	14 20 (17) 17	23 29 (25) 24	22 21 (23) 25	18 19 (18) 16
	313 †	104 101 (104) 107	19 16 (16) 14	26 21 (24) 26	29 29 (26) 21	13 14 (15) 18
	1250 †	109 99 (104) 105	15 11 (15) 19	31 27 (30) 32	26 24 (24) 22	19 13 (15) 14
	5000 †	97 107 (99) 93	15 14 (17) 21	32 25 (29) 29	27 25 (25) 24	14 12 (13) 13
陽性対照	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	コロニー数/プレート	794 894 (858) 887	289 297 (299) 310	156 161 (160) 162	313 318 (311) 301	1964 1822 (1880) 1853
	名 称	-	-	-	-	-
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	-	-	-	-	-
	コロニー数/プレート	- - (-)	- - (-)	- - (-)	- - (-)	- - (-)

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すこと。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値記入すること。
4. プレート上に沈殿が析出した場合は、その用量に†印を付すこと。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記載すること。

[略号]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide、SAZ: Sodium azide

ICR-191: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine.2HCl

(別表1)

試 験 結 果 表

被験物質の名称：ピグメントエロー-14 用量設定試験

試験実施期間		2001年1月17日 より 2001年1月19日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		<i>S. typhimurium</i> TA100	<i>S. typhimurium</i> TA1535	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S. typhimurium</i> TA98	<i>S. typhimurium</i> TA1537	
+S9 mix	陰性対照	120 103 (110) 108	13 11 (12) 12	28 34 (32) 34	29 29 (27) 24	11 13 (14) 19	
	0.305	97 97 (95) 91	15 11 (13) 13	34 33 (33) 31	29 24 (26) 26	13 12 (12) 10	
	1.22	110 92 (104) 111	15 18 (17) 19	32 33 (31) 28	27 21 (24) 24	15 12 (14) 14	
	4.88	119 109 (110) 103	12 17 (15) 15	30 35 (31) 27	37 21 (27) 22	16 18 (16) 13	
	19.5	104 112 (111) 116	11 15 (15) 19	28 33 (30) 30	29 33 (30) 28	12 10 (11) 12	
	78.1 †	111 102 (104) 98	15 11 (14) 17	36 36 (36) 35	26 35 (32) 34	19 18 (19) 20	
	313 †	118 111 (115) 115	15 12 (13) 13	36 29 (31) 29	31 36 (32) 28	13 10 (11) 11	
	1250 †	118 111 (112) 106	17 11 (16) 19	32 29 (32) 36	24 19 (23) 27	11 18 (15) 15	
	5000 †	114 104 (111) 116	18 15 (17) 18	26 23 (27) 32	32 31 (29) 25	18 18 (16) 11	
陽性対照	名 称	—	—	—	—	—	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	—	—	—	—	—	
	コロニー数/プレート	— — (—) —	— — (—) —	— — (—) —	— — (—) —	— — (—) —	
	名 称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00	
	コロニー数/プレート	825 811 (820) 825	205 210 (205) 200	329 293 (308) 303	301 246 (272) 269	82 93 (88) 88	

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すこと。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値記入すること。
4. プレート上に沈殿が析出した場合は、その用量に†印を付すこと。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記載すること。

[略号]

B[a]P: Benzo[a]pyrene、 2AA: 2-Aminoanthracene

(別表1)

試 験 結 果 表

被験物質の名称：ピグメントエロー-14 本試験

試験実施期間		2001年 1月 24日 より 2001年 1月 26日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		<i>S. typhimurium</i> TA100	<i>S. typhimurium</i> TA1535	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S. typhimurium</i> TA98	<i>S. typhimurium</i> TA1537	
-S9 mix	陰性対照	100 104 (104) 109	11 13 (13) 14	32 27 (28) 26	26 21 (23) 21	16 11 (13) 13	
	156 †	103 117 (112) 115	18 17 (18) 19	28 22 (25) 25	28 22 (26) 28	15 14 (16) 19	
	313 †	124 102 (117) 124	12 16 (14) 13	26 28 (28) 29	22 21 (21) 21	14 13 (13) 13	
	625 †	104 99 (103) 106	16 17 (15) 12	22 34 (27) 26	22 23 (24) 27	12 13 (14) 16	
	1250 †	93 115 (101) 95	17 17 (15) 11	30 28 (29) 28	19 27 (23) 24	16 11 (13) 12	
	2500 †	96 96 (98) 102	15 11 (15) 18	29 28 (27) 23	19 20 (20) 20	16 11 (14) 14	
	5000 †	124 91 (105) 101	16 10 (12) 11	23 21 (22) 23	20 22 (23) 27	15 11 (12) 11	
+S9 mix	陰性対照	121 124 (120) 115	16 12 (13) 11	32 29 (31) 31	33 25 (28) 27	11 15 (14) 16	
	156 †	96 95 (96) 98	10 15 (14) 16	26 29 (29) 32	26 37 (29) 23	11 14 (13) 14	
	313 †	119 97 (110) 115	10 12 (11) 12	33 23 (26) 22	24 34 (29) 29	13 13 (12) 11	
	625 †	106 129 (114) 106	10 18 (13) 12	29 24 (25) 22	28 20 (25) 27	10 15 (13) 14	
	1250 †	93 101 (103) 116	13 11 (14) 18	29 28 (30) 32	29 23 (27) 29	11 9 (9) 8	
	2500 †	105 98 (102) 102	18 18 (18) 18	24 26 (28) 35	23 25 (24) 24	15 11 (13) 13	
	5000 †	110 106 (114) 125	12 14 (12) 9	32 32 (30) 27	30 23 (26) 24	16 10 (13) 12	
陽性対照	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00	
	コロニー数/プレート	783 825 (797) 783	351 350 (351) 351	164 177 (170) 169	539 553 (552) 563	2119 2088 (2078) 2027	
	名 称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00	
	コロニー数/プレート	971 983 (975) 971	181 182 (183) 186	400 364 (379) 372	313 309 (312) 315	93 96 (95) 97	

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すこと。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値記入すること。
4. プレート上に沈殿が析出した場合は、その用量に†印を付すこと。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記載すること。

[略号]

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

SAZ: Sodium azide

ICR-191: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropyl]aminolacridine.2HCl

B[a]P: Benzo[a]pyrene

2AA: 2-Aminoanthracene

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

(別表2)

比 活 性

	菌株名	- S 9 m i x		+ S 9 m i x	
		比活性	計算に用いた用量	比活性	計算に用いた用量
用 量 設 定 試 験					
本 試 験					

注) 陰性判定のため比活性は算出しなかった。

GENETIC TOXICITY IN VITRO (BACTERIAL TEST)

TEST SUBSTANCE

- **Identity:** Pigment Yellow 14 (CAS No. 5468-75-7)
- **Remarks:** Synonym: Benzidine Yellow
Source: [REDACTED] Ltd., Lot No. [REDACTED] wavelength of maximum absorption at 421.5 nm, molar absorptivity 915.
Impurity: loss on drying 0.36 wt%, residue on ignition 11.8 wt%. Kept in a refrigerator until use.

METHOD

- **Method/guideline:** OECD TG 471
- **Test type:** Reverse mutation assay
- **GLP:** Yes
- **Year:** 2001
- **Species/Strain:** *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA1537 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA*
- **Metabolic activation:** With and without S9 from rat liver, induced by phenobarbital and 5,6-benzoflavone.
- **Statistical method:** No statistical analysis was done.

REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

- **Study Design**
 - **Concentration:** Dose Range Finding Study: 0.305, 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250 and 5000 µg/plate (with and without S9, five strains)
Main Study: 156, 313, 625, 1250, 2500 and 5000 µg/plate (with and without S9, five strains)
 - **Number of replicates:** 2
 - **Plates/test:** 3
 - **Procedure:** Pre-incubation Method
 - **Solvent:** Dimethylsulfoxide (DMSO)
 - **Positive controls:**
 - 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide used for *Salmonella typhimurium* TA100, TA98 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA*, without metabolic activation.
 - Sodium azide used for *Salmonella typhimurium* TA1535, without metabolic activation.
 - 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino] acridine. 2HCl used for *Salmonella typhimurium* TA1537, without metabolic activation.
 - Benzo[a]pyrene used for *Salmonella typhimurium* TA100, TA98 and TA1537, with metabolic activation.
 - 2-Aminoanthracene used for *Salmonella typhimurium* TA1535 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA*, with metabolic activation.

RESULTS

- **Cytotoxic concentration:**

Inhibition of bacterial growth was not observed in the agar plate up to 5000 µg/plate in the dose range finding study or main study, irrespective of bacterial strains or the presence or absence metabolic activation.

- **Genotoxic effects:**

With metabolic activation: Negative

Without metabolic activation: Negative

REMARKS FIELD FOR RESULTS

CONCLUSIONS

Bacterial gene mutation is negative with and without metabolic activation.

DATA QUALITY

- **Reliability:**

Valid without restriction

Remarks field for Data Reliability

Well-conducted study, carried out by BOZO Research Center Inc. (Japan)

REFERENCES (Free Text):

- Bruce N. Ames, Joyce McCann and Edith Yamasaki. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research. 31, 347-364, 1975
- Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research. 113, 173-215, 1983
- M. Ishidate (supervised), T. Nomi and M. Matsui (edited). Data Collection in Mutagenicity Tests with Bacteria. LIC 1991
- The Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Drug Evaluation Committee, Non-clinical Research Division, Mutagenicity Test Group. Q & A, Mutagenicity Tests in the Toxicity Study Guidelines of Pharmaceuticals by the Ministry of Health and Welfare. Scientist-sha 1992
- Japan Bio-Assay Research Center (edited). Explanation of the methods of mutagenicity tests using bacteria, Fuji Offset Co., Ltd. 1999

GENERAL REMARKS

None