食薬セ研第１１－１７４６号

２００１年　６月１８日

ディスパーズレッド206
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 …… 2

材料および方法 …… 3

結果および考察 …… 7

文　　献 …… 8

Tables　1～4

【要　　約】

ディスパーズレッド206 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、陽性の結果を得た。

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 回の本試験および再現性試験を行った。用量設定試験を 50.0～5000μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験でともに生育阻害は認められなかった。したがって、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験について 313～5000μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で 5 用量を設定して実施した。その結果、TA98 の S9 mix 無添加試験および添加試験については、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な変異コロニー数の増加が、2 回の本試験ともに認められた。一方、1 回目の本試験では、TA1537 の S9 mix 無添加試験および TA100 の S9 mix 添加試験において、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたが、再現性はみられなかった。そのため、これらについては、再現性試験を実施した。その結果、陰性対照値の 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。

以上の結果から、ディスパーズレッド206 は、用いた試験系において変異原性を有するもの（陽性）と判定した。

【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、ディスパーズレッド206 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[1]により実施した。

この試験は、サルモネラ菌（*Salmonella typhimurium*）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[2]、ならびに大腸菌（*Escherichia coli*）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[3]を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、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、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素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 添加試験とからなっている。

この試験は、「新規化学物質等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、一部改正平成９年10月31日、環保安第287号、衛生第127号、平成09・10・31基局第２号）および「OECD毒性試験ガイドライン：471」に準拠し、「化学物質 GLP」（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】

1．被験物質

ディスパーズレッド206（CAS No. 26630-87-5）は、分子式 $C_{24}H_{22}O_3N_5SCl$、分子量495.99 の赤色の湿潤品である。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 39.1wt%であり、　　から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

本被験物質は、50 mg/mL の濃度では水よりジメチルスルホキシド（DMSO）中で良好な懸濁性が得られることから、DMSO（ロット番号：KSJ6393、和光純薬工業㈱）に懸濁して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。調製にあたっては、秤量した重量に 0.391 をかけて被験物質の純度換算を行った。調製時に、発熱、発泡、変色等の変化は認められなかった。

2．陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌に用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれ結果の各 Table 中に示した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル）アクリルアミド
（AF2、和光純薬工業㈱　ロット番号 WTQ0059、　純度98%以上）
アジ化ナトリウム　（SA、 和光純薬工業㈱　ロット番号 DLL3931、　純度98%以上）
9-アミノアクリジン　（9AA、Sigma Chem. Co. ロット番号 106F06681、純度97%以上）
2-アミノアントラセン（2AA、和光純薬工業㈱　ロット番号 DLH6052、　純度90%以上）

AF2、9AA および 2AA は DMSO に、SA は超純水に溶解し、所定の濃度に調製したものを－20℃で凍結保存し、解凍後速やかに試験に用いた。

3．検定菌

試験には、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium の 4 菌株は1997年 8 月 7 日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年

4月9日に日本バイオアッセイ研究センター(　　:から分与された。

検定菌は－80℃で凍結保存したものを用いた。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異（*rfa*）、アンピシリン耐性因子 pKM 101(プラスミド）の有無および陰性対照群と陽性対照群の変異コロニー数について調べ、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 Ltd.、ロット番号：02859365）を入れたL字型試験管に解凍した菌液を一定量加え、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。分光光度計により 660 nm の吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

試験に用いた検定菌液の、段階希釈法により求めた生菌数を Appendix 2に示した。

4．試験材料

1）合成培地

培地は、極東製薬工業㈱製の最少グルコース寒天培地（ロット番号：DZA12001、2000年2月24日製造）を用いた。なお、培地1L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
クエン酸･1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
大洋寒天（清水食品）	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

2）トップアガー

下記の水溶液 (A) および (B) または (C) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー（Difco Lab.）	0.6 w/v%
塩化ナトリウム	0.5 w/v%

(B) *Salmonella typhimurium* 用

L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L

(C) *Escherichia coli* 用

L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3） S9 mix

S9 mix 1 mL あたりの組成は下記のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 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㈱、ロット番号：RAA-422、2000年3月10日製造）を購入し、-80℃で凍結保存し、用時に解凍して用いた。

5．試験操作

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℃で20分間プレインキュベーションしたのち、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（陰性対照）または陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌の陽性対照物質の名称および用量は結果の各 Table 中に示した。陰性および陽性対照試験の結果については、同時に実施した他試験と共通に

用いた。

培養は37℃で48時間行い、発生した変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈澱の有無は、目視により確認した。また、生育阻害の有無については、目視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。平板は各用量につき用量設定試験では1枚、本試験および再現性試験では3枚とし、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。対照試験では各々3枚の平板を使用した。

最高用量の被験物質 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ最少グルコース寒天培地上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

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。また、TA1537 の S9 mix 無添加試験および TA100 の S9 mix 添加試験については、2回の本試験の結果が異なったため、再現性試験を行った。

6．判定

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、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、陰性対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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】

1．用量設定試験

「新規化学物質等に係る試験の方法について」および「OECD 毒性試験ガイドライン：471」の記載に従って、50.0～5000μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈澱は S9 mix 無添加試験および添加試験ともに 150μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 以上の用量で認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000μg/ﾌﾟﾚｰﾄ とした。

2．本試験

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、313～5000μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で公比を2として2回の本試験を実施した（Table 2、3）。その結果、2回の本試験の TA98 において、S9 mix 無添加試験では、2500μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 以上あるいは 5000μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量で、S9 mix 添加試験ではすべての用量で、変異コロニー数の増加が陰性対照値の2倍以上となり、用量依存性が認められた。また、1回目の本試験では、TA1537 の S9 mix 無添加試験については 2500μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量で、TA100 の S9 mix 添加試験については 5000μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量で、陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたが、再現性はみられなかった。

3．再現性試験

TA1537 の S9 mix 無添加試験および TA100 の S9 mix 添加試験については、2回の本試験の結果が異なることから、本試験と同じ用量を用いて再現性試験を実施した（Table 4）。その結果、いずれの検定菌においても、陰性対照値の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。

すべての試験において、用いた最高用量の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験では、いずれの検定菌においても陽性対照物質

の変異原性が検出され、陰性対照値とともに計測された変異コロニー数は背景データ（Appendix 3）の変動範囲内（平均値±3×標準偏差）であったことから、本試験系の有効性が確認された。

ディスパーズレッド206 は、当研究所で本試験と並行して実施した、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では染色体の構造異常および倍数性細胞が誘発され、陽性であった[4]。また、関連物質については、検索を行ったが、情報は得られなかった。

以上の結果に基づき、ディスパーズレッド206 は、用いた試験系において変異原性を有するもの（陽性）と判定した。

【文　　献】

1）Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds, Springer, Berlin (1980) pp. 273-285

2）Maron, D.M., Ames, B.N. : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113 : 173-215 (1983)

3）Green, M.H.L. : Mutagen testing using Trp^+ reversion in *Escherichia coli*. in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187

4）　　：「ディスパーズレッド206 のチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用い

る染色体異常試験」，食薬セ研第11－1749号（2001）

Table 1. Cytotoxicity of Disperse Red 206 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 *uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	169 153 160 (161 ± 8.0)	11 17 10 (13 ± 3.8)	28 30 38 (32 ± 5.3)	39 26 18 (28 ± 10.6)	7 18 18 (14 ± 6.4)
	50.0	138	12	28	41	12
	150 †	141	10	35	26	16
	500 †	155	11	24	30	10
	1500 †	183	12	24	33	17
	5000 †	179	12	30	50	17
S9 mix (+)	0	149 141 176 (155 ± 18.3)	6 9 12 (9 ± 3.0)	43 30 40 (38 ± 6.8)	36 42 30 (36 ± 6.0)	19 14 21 (18 ± 3.6)
	50.0	225	15	31	45	16
	150 †	218	11	43	64	19
	500 †	237	18	39	69	18
	1500 †	240	12	37	86	30
	5000 †	320	21	37	92	25
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies / plate	563 562 564 (563 ± 1.0)	577 751 715 (681 ± 91.8)	273 307 266 (282 ± 21.9)	605 699 677 (660 ± 49.2)	1118 1048 981 (1049 ± 68.5)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	1061 1328 1148 (1179 ± 136.2)	339 377 363 (360 ± 19.2)	933 936 999 (956 ± 37.3)	423 446 414 (428 ± 16.5)	287 296 200 (261 ± 53.0)

The purity of the test substance was 39.1 wt%. This substance contained 60.9 wt% water as impurity.

The amount of the test sustance was multiplying the weighed amount of the test substance by 0.391 to adjust for purity. .

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

†: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Table 2. Mutagenicity of Disperse Red 206 on bacteria (I)

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 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	136	128	142	9	10	18	31	24	30	37	28	29	8	11	9
		(135 ± 7.0)			(12 ± 4.9)			(28 ± 3.8)			(31 ± 4.9)			(9 ± 1.5)		
	313 †	127	152	138	16	6	13	29	20	32	26	35	41	7	10	10
		(139 ± 12.5)			(12 ± 5.1)			(27 ± 6.2)			(34 ± 7.5)			(9 ± 1.7)		
	625 †	182	170	178	8	18	13	33	36	20	47	35	32	10	15	9
		(177 ± 6.1)			(13 ± 5.0)			(30 ± 8.5)			(38 ± 7.9)			(11 ± 3.2)		
	1250 †	218	253	268	11	11	11	30	34	24	56	54	35	21	12	16
		(246 ± 25.7)			(11 ± 0.0)			(29 ± 5.0)			(48 ± 11.6)			(16 ± 4.5)		
	2500 †	182	175	164	10	18	11	20	31	21	57	70	73	21	18	18
		(174 ± 9.1)			(13 ± 4.4)			(24 ± 6.1)			(67 ± 8.5)			(19 ± 1.7)		
	5000 †	194	187	158	8	19	10	24	21	31	91	68	77	15	10	12
		(180 ± 19.1)			(12 ± 5.9)			(25 ± 5.1)			(79 ± 11.6)			(12 ± 2.5)		
S9 mix (+)	0	134	159	140	9	15	9	32	49	35	38	45	49	18	20	25
		(144 ± 13.1)			(11 ± 3.5)			(39 ± 9.1)			(44 ± 5.6)			(21 ± 3.6)		
	313 †	183	208	197	16	7	15	55	38	46	94	110	82	29	26	26
		(196 ± 12.5)			(13 ± 4.9)			(46 ± 8.5)			(95 ± 14.0)			(27 ± 1.7)		
	625 †	172	195	228	17	16	20	47	51	37	92	78	100	9	22	24
		(198 ± 28.1)			(18 ± 2.1)			(45 ± 7.2)			(90 ± 11.1)			(18 ± 8.1)		
	1250 †	212	244	160	17	18	19	47	39	44	119	148	91	24	19	25
		(205 ± 42.4)			(18 ± 1.0)			(43 ± 4.0)			(119 ± 28.5)			(23 ± 3.2)		
	2500 †	232	260	240	19	13	17	37	38	38	155	141	141	26	28	31
		(244 ± 14.4)			(16 ± 3.1)			(38 ± 0.6)			(146 ± 8.1)			(28 ± 2.5)		
	5000 †	390	382	368	18	12	21	37	42	38	152	140	145	34	29	25
		(380 ± 11.1)			(17 ± 4.6)			(39 ± 2.6)			(146 ± 6.0)			(29 ± 4.5)		
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	510	558	643	782	641	648	278	241	264	675	691	655	1110	1081	1007
		(570 ± 67.4)			(690 ± 79.5)			(261 ± 18.7)			(674 ± 18.0)			(1066 ± 53.1)		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	927	990	1015	471	417	467	833	860	1011	469	413	440	336	349	332
		(977 ± 45.3)			(452 ± 30.1)			(901 ± 95.9)			(441 ± 28.0)			(339 ± 8.9)		

The purity of the test substance was 39.1 wt%. This substance contained 60.9 wt% water as impurity.

The amount of the test sustance was multiplying the weighed amount of the test substance by 0.391 to adjust for purity. .

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

†: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Table 3. Mutagenicity of Disperse Red 206 on bacteria (II)

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 *uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	162 171 149 (161 ± 11.1)	13 9 9 (10 ± 2.3)	29 19 25 (24 ± 5.0)	24 23 28 (25 ± 2.6)	6 11 8 (8 ± 2.5)
	313 †	157 145 155 (152 ± 6.4)	14 10 10 (11 ± 2.3)	32 24 27 (28 ± 4.0)	21 39 36 (32 ± 9.6)	7 6 6 (6 ± 0.6)
	625 †	173 186 167 (175 ± 9.7)	13 11 8 (11 ± 2.5)	20 21 23 (21 ± 1.5)	28 36 32 (32 ± 4.0)	5 16 6 (9 ± 6.1)
	1250 †	134 151 154 (146 ± 10.8)	16 5 16 (12 ± 6.4)	23 27 26 (25 ± 2.1)	41 41 41 (41 ± 0.0)	8 13 9 (10 ± 2.6)
	2500 †	268 202 188 (219 ± 42.7)	15 16 13 (15 ± 1.5)	14 27 29 (23 ± 8.1)	41 43 48 (44 ± 3.6)	8 8 10 (9 ± 1.2)
	5000 †	182 177 194 (184 ± 8.7)	12 11 10 (11 ± 1.0)	17 33 26 (25 ± 8.0)	59 61 61 (60 ± 1.2)	15 11 17 (14 ± 3.1)
S9 mix (+)	0	186 195 181 (187 ± 7.1)	12 12 7 (10 ± 2.9)	40 27 22 (30 ± 9.3)	35 37 45 (39 ± 5.3)	13 18 16 (16 ± 2.5)
	313 †	192 158 217 (189 ± 29.6)	14 17 13 (15 ± 2.1)	37 39 43 (40 ± 3.1)	84 84 81 (83 ± 1.7)	17 27 28 (24 ± 6.1)
	625 †	200 171 205 (192 ± 18.4)	11 5 18 (11 ± 6.5)	34 32 37 (34 ± 2.5)	78 93 90 (87 ± 7.9)	16 22 13 (17 ± 4.6)
	1250 †	214 201 219 (211 ± 9.3)	21 19 7 (16 ± 7.6)	26 27 32 (28 ± 3.2)	98 89 85 (91 ± 6.7)	19 23 16 (19 ± 3.5)
	2500 †	298 220 234 (251 ± 41.6)	12 15 18 (15 ± 3.0)	23 34 34 (30 ± 6.4)	115 99 102 (105 ± 8.5)	16 12 13 (14 ± 2.1)
	5000 †	285 255 268 (269 ± 15.0)	21 11 17 (16 ± 5.0)	30 35 30 (32 ± 2.9)	136 121 141 (133 ± 10.4)	15 18 17 (17 ± 1.5)
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies / plate	548 574 590 (571 ± 21.2)	685 661 683 (676 ± 13.3)	240 228 105 (191 ± 74.7)	640 646 651 (646 ± 5.5)	991 1057 1091 (1046 ± 50.8)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	1017 1025 1007 (1016 ± 9.0)	490 453 443 (462 ± 24.8)	1009 989 944 (981 ± 33.3)	352 397 445 (398 ± 46.5)	347 454 414 (405 ± 54.1)

The purity of the test substance was 39.1 wt%. This substance contained 60.9 wt% water as impurity.

The amount of the test sustance was multiplying the weighed amount of the test substance by 0.391 to adjust for purity. .

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

†: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Table 4. Mutagenicity of Disperse Red 206 on bacteria (confirmation)

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				TA1537
S9 mix (-)	0					13 14 18 (15 ± 2.6)
	313 †					9 8 11 (9 ± 1.5)
	625 †					8 15 13 (12 ± 3.6)
	1250 †					15 8 14 (12 ± 3.8)
	2500 †					26 14 8 (16 ± 9.2)
	5000 †					14 18 21 (18 ± 3.5)
S9 mix (+)	0	155 156 156 (156 ± 0.6)				
	313 †	260 264 170 (231 ± 53.2)				
	625 †	221 198 205 (208 ± 11.8)				
	1250 †	200 221 224 (215 ± 13.1)				
	2500 †	264 267 335 (289 ± 40.2)				
	5000 †	326 284 294 (301 ± 21.9)				
Positive control S9 mix (-)	Chemical					9AA
	Dose (μg /plate)					80
	Number of colonies / plate					1097 1065 1097 (1086 ± 18.5)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA				
	Dose (μg /plate)	1				
	Number of colonies / plate	1163 1151 1146 (1153 ± 8.7)				

The purity of the test substance was 39.1 wt%. This substance contained 60.9 wt% water as impurity.

The amount of the test sustance was multiplying the weighed amount of the test substance by 0.391 to adjust for purity. .

9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

†: Precipitate was observed on the surface of agar plates.