

# 最終報告書

C.I. フルオレセントブライトナー271 の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : 7815 ( 115-180 )

平成 17 年 11 月 11 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

1. 要約.....	5
2. 表題.....	6
3. 試験目的.....	6
12. 被験物質.....	8
13. 試験材料および方法.....	10
14. 試験結果.....	16
15. 考察および結論.....	17
16. 参考文献.....	18
Figures	
Figure 1 Dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt in strain TA100.....	20
Figure 2 Dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt in strain TA1535.....	21
Figure 3 Dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt in strain WP2uvrA.....	22

Figure 4	Dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt in strain TA98 .....	23
Figure 5	Dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt in strain TA1537 .....	24
Figure 6	Bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt in strain TA100 .....	25
Figure 7	Bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt in strain TA1535 .....	26
Figure 8	Bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt in strain WP2 <i>uvrA</i> .....	27
Figure 9	Bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt in strain TA98 .....	28
Figure 10	Bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt in strain TA1537 .....	29
Tables		
Table 1	Summary data on dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis [(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt [Non-activation method: -S9] .....	30
Table 2	Summary data on dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis [(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt [Activation method: +S9] .....	31
Table 3	Summary data on bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis [(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt [Non-activation method: -S9] .....	32

Table 4	Summary data on bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis [(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt [Activation method: +S9] .....	33
---------	--	----

## 1. 要約

当該試験条件下において、C.I. フルオレセントブライトナー271 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。

C.I. フルオレセントブライトナー271 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、C.I. フルオレセントブライトナー271 処理では、8.19~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  のいずれの用量においても、ラット肝マイクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照と比較して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。

一方、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、用量設定試験ならびに復帰突然変異試験 (本試験) により、試験結果の再現性が確認された。

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

C.I. フルオレセントブライトナー271

(英名 : 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt)

12.2. ロット番号

12.3. 純度/含量

91.0%

12.4. 不純物の名称および濃度

NaCl : 0.32%, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 0.01%, 水 : 6.3%,  
残り 2.37%不明 (各成分 1%未満)

12.5. 製造元

12.6. 保存条件

室温

12.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-3 : 実測値 17.9~29.8°C, 2004年7月28日~2005年1月17日)

12.8. CAS No.

41267-43-0

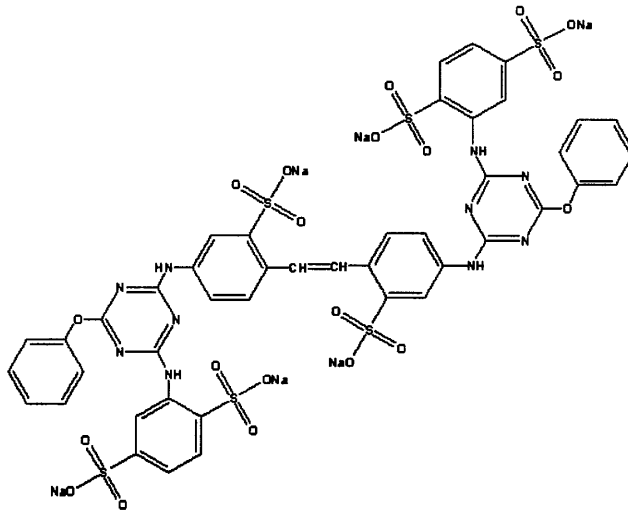
12.9. 化学名

1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt

12.10. 一般名

スチルベン系蛍光増白剤  
フルオレスセントー271

12.11. 化学構造



12.12. 分子式

$C_{44}H_{28}N_{10}Na_6O_{20}S_6$

12.13. 分子量

1347.08

12.14. 物質の状態

淡黄色結晶

12.15. 溶解性

水に可溶，有機溶媒に不溶～難溶

12.16. 残余被験物質の処理

1 g 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，残りは安定性分析のため，被験物質等管理責任者を介して へ返却した。分析の結果(2005年10月27日付報告)，被験物質が安定であることが確認された。

### 13. 試験材料および方法

#### 13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100	(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	WP2 <i>uvrA</i>	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学から、また、大腸菌については昭和58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。

平成15年9月16日～同年9月19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。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO, GC用, 純度99.9%, Lot No. K30049278, 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, 三洋電機バイオメディカ, 設定値-80°C, 基準値-60°C以下)に保存した。

#### 13.2. 培地の調製

##### 13.2.1. 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(平成16年6月15日製造, Lot No. ANI540FT, 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した。

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. 40127, 伊那食品工業)	11.0	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー

塩化ナトリウム 0.5 w/v%および寒天 (Bacto-agar, Lot No. 3069265 【用量設定試験】または 1124004 【復帰突然変異試験】, BD Diagnostic Systems) 0.6 w/v%を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した。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) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 301C2275, 関東化学) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 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. 008D2026, 関東化学) 水溶液を同じく 1 容量加えた。

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (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を 50  $\mu$ L 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 で静置した。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。

菌濃度が適正であることを ATP フォトメーター (ルミテスター-K-100, キッコーマン) を用いて確認した。

試験	生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	2.63	3.66	3.95	3.35	1.70
復帰突然変異試験	3.60	3.37	3.96	3.31	1.56

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-505, 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。

13.4.1. 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以下に示した.

ロット番号	RAA-505
製造年月日	平成 16 年 7 月 2 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット : Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	204~239 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	27.04 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

S9	0.1	mL
MgCl <sub>2</sub>	8	μmol
KCl	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

13.5. 被験物質液の調製

被験物質は水に可溶であることから, 被験物質を注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. K3G77, 大塚製薬工場) に溶解し, 調製原液とした. なお, 被験物質の純度は 95%未満 (91.0%) であるため, 最高用量の被験物質秤量の際に純度換算を実施した.

用量設定試験では, 使用直前に調製原液 (50.0 mg/mL 液) を準備した. この 50.0 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し, 20.0, 8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 溶液を調製した. 調製後, 速やかに使用した.

復帰突然変異試験では, 使用直前に調製原液 (50.0 mg/mL 液) を準備した. この 50.0 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し, 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 および 0.781

mg/mL 溶液を調製した。調製後、速やかに使用した。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質の溶媒である注射用水を使用した。

13.6.2. 陽性対照

調製済み陽性対照物質溶液 (オリエンタル酵母工業) を試験に使用した。陽性対照物質名および用量を以下に示した。

- AF-2 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
 NaN<sub>3</sub> アジ化ナトリウム  
 9-AA 9-アミノアクリジン塩酸塩  
 2-AA 2-アミノアントラセン

《代謝活性化系非存在下: -S9 処理》

菌株	化合物名	陽性対照調製日	用量 (µg/プレート)	陽性対照溶液濃度 (µg/mL)	ロット番号
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2003.4.11	0.01	0.1	030411AF01
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2003.4.11	0.1	1.0	030411AF10
ネズミチフス菌 TA1535	NaN <sub>3</sub>	2003.4.10	0.5	5.0	030410N
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2003.4.11	80	800	030411A9
大腸菌 WP2 <sub>uvrA</sub>	AF-2	2003.4.11	0.01	0.1	030411AF01

《代謝活性化系存在下: +S9 処理》

ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2003.4.10	1.0	10	030410A210
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2003.4.10	0.5	5.0	030410A205
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2003.4.10	2.0	20	030410A220
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2003.4.10	2.0	20	030410A220
大腸菌 WP2 <sub>uvrA</sub>	2-AA	2003.4.10	10	100	030410A2100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験—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, 平成3年) に準じて設定した。

13.6.3. 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  $\mu$ L あるいは S9 mix 500  $\mu$ L にトッアガーをそれぞれ 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C 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。

C.I. フルオレセントブライナー271 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。

13.7. 用量設定試験（予備試験）

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000  $\mu$ g/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  $\mu$ g/プレートの計 8 用量を設定した。

13.7.2. 使用プレート数および識別方法

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。

13.7.3. 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  $\mu$ L、次いで代謝活性化系非存在下（-S9 処理）の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.4）を 500  $\mu$ L、代謝活性化系存在下（+S9 処理）の場合、S9 mix を 500  $\mu$ L 分注した。さらに前培養した試験菌株懸濁液 100  $\mu$ L を加えた後、ウォーターバスシェーカー（M-100<sup>N</sup>、タイテック）を用いて 37°C の条件で 20 分間振盪（120 回/分、プレインキュベーション）した。振盪終了後、トッアガー 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°C の条件で 48 時間培養した。

13.7.4. 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析出等の有無を肉眼で観察した。

13.7.5. 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（ $\times 40$ ）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数した。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。

13.8. 復帰突然変異試験 (本試験)

13.8.1. 用量

用量設定試験の結果, 代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の TA1537 株において, 5000 µg/プレート の用量で生育阻害作用が認められ, コロニー数が減少した. その他においては試験菌株に対する生育阻害作用は認められなかった. また, 全ての菌株において変異原性は認められなかった. したがって, 復帰突然変異試験においては, 5000 µg/プレートを最高用量に以下に示した用量 (6 または 7 用量) を設定した.

《代謝活性化系非存在下: -S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100	—	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	—	156	313	625	1250	2500	5000
WP2uvrA	—	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	—	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	78.1	156	313	625	1250	2500	5000

《代謝活性化系存在下: +S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100		156	313	625	1250	2500	5000
TA1535		156	313	625	1250	2500	5000
WP2uvrA		156	313	625	1250	2500	5000
TA98		156	313	625	1250	2500	5000
TA1537		156	313	625	1250	2500	5000

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた.

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた.

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた.

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた.

13.9. 結果の解析

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。

#### 14. 試験結果

##### 14.1. 用量設定試験

試験結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した。

C.I. フルオレセントブライトナー271 処理での復帰変異コロニー数は、-S9 処理および+S9 処理のいずれの試験菌株においても明確な増加は認められなかった。また、-S9 処理 TA1537 株の 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  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、コロニー数が減少した。その他においては生育阻害作用は認められなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。

##### 14.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

処理開始時およびコロニー数計測時において、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

##### 14.3. 復帰突然変異試験 (本試験)

試験結果を Figure 6~10 および Table 3, 4 に示した。

C.I. フルオレセントブライトナー271 処理での復帰変異コロニー数は、-S9 処理および+S9 処理のいずれの試験菌株においても明確な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、両処理ともいずれの試験菌株においても観察されなかった。ただし、-S9 処理 TA1537 株の 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量においてコロニー数が減少した。

一方、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。

##### 14.4. 被験物質の析出等 (復帰突然変異試験)

処理開始時およびコロニー数計測時において、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

以上、用量設定試験および本試験により、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下の両処理法において結果の再現性が確認された。

## 15. 考察および結論

C.I. フルオレセントブライトナー271 の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、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/プレートまで検討した結果、C.I. フルオレセントブライトナー271 処理群では、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照と比べて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。

これら両処理法での試験結果は、用量設定試験ならびに復帰突然変異試験により再現性が確認された。

また、本被験物質 C.I. フルオレセントブライトナー271 (1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]] bis-,hexasodium salt) の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告は現在までない。

類縁体である Fluorescent brightener 24, Fluorescent brightener 225 および Fluorescent brightener 260 については CHL 細胞を用いた染色体異常試験、Don 細胞を用いた染色体異常試験および Don 細胞を用いた姉妹染色分体交換試験で陰性<sup>1,2)</sup>と報告されている。また、Fluorescent brightener 84 についても CHL 細胞を用いた染色体異常試験で陰性<sup>1)</sup>と報告されている。

なお、陰性対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数は、いずれも当施設の背景データ (Appendix 1) の範囲内であり、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、C.I. フルオレセントブライトナー271 の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

16. 参考文献

- 1) 賀田恒夫・石館基監修“環境変異原性データ集1”, サイエンティスト社, 東京, 1980, p199-200.
- 2) 祖父尼俊雄監修“染色体異常試験データ集<改訂1998年版>”, エル・アイ・シー, 東京, 1999, p238-239.



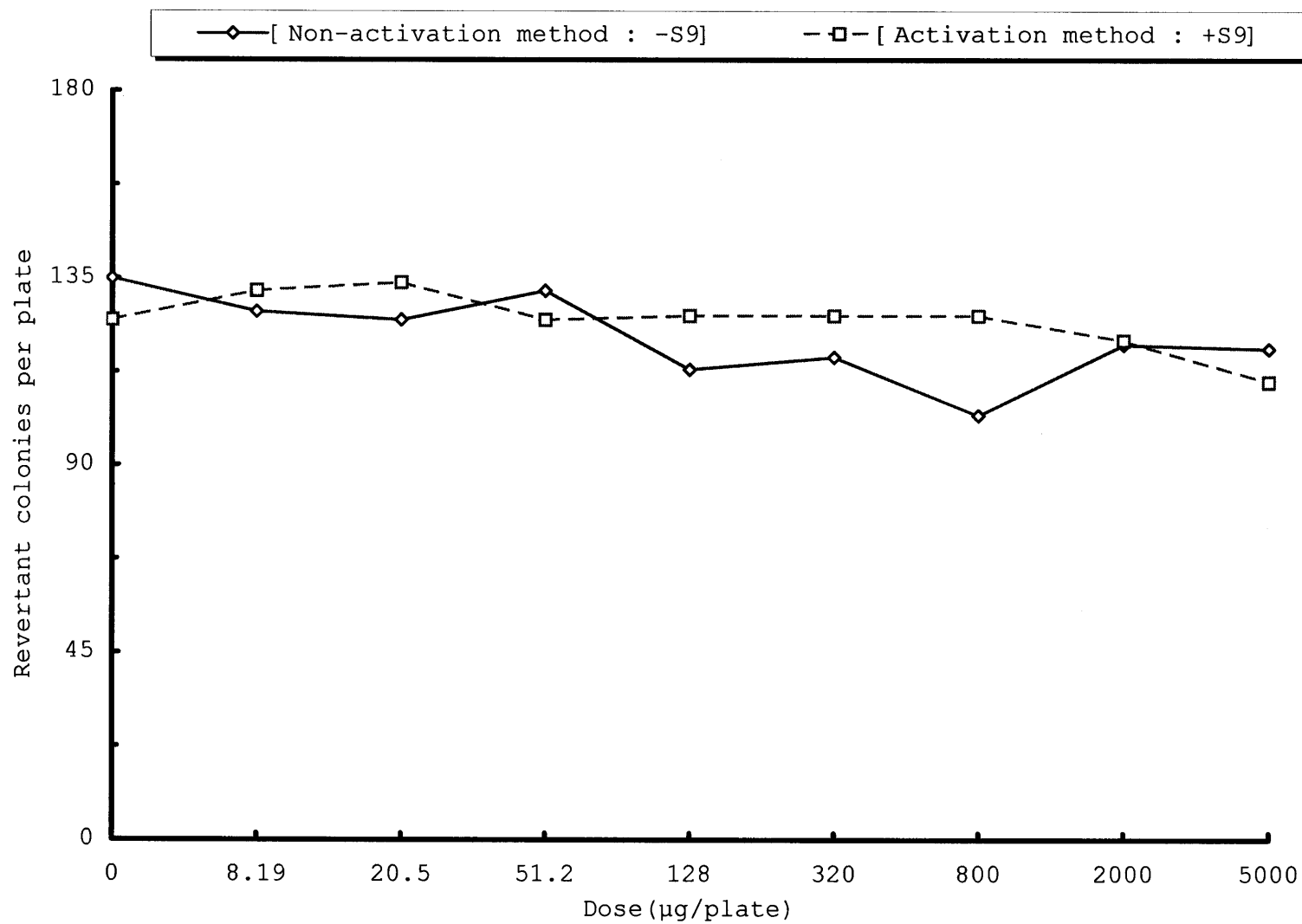


Figure 1. Dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis(3-sulfo-4,1-phenylene) imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]bis-,hexasodium salt in strain TA100

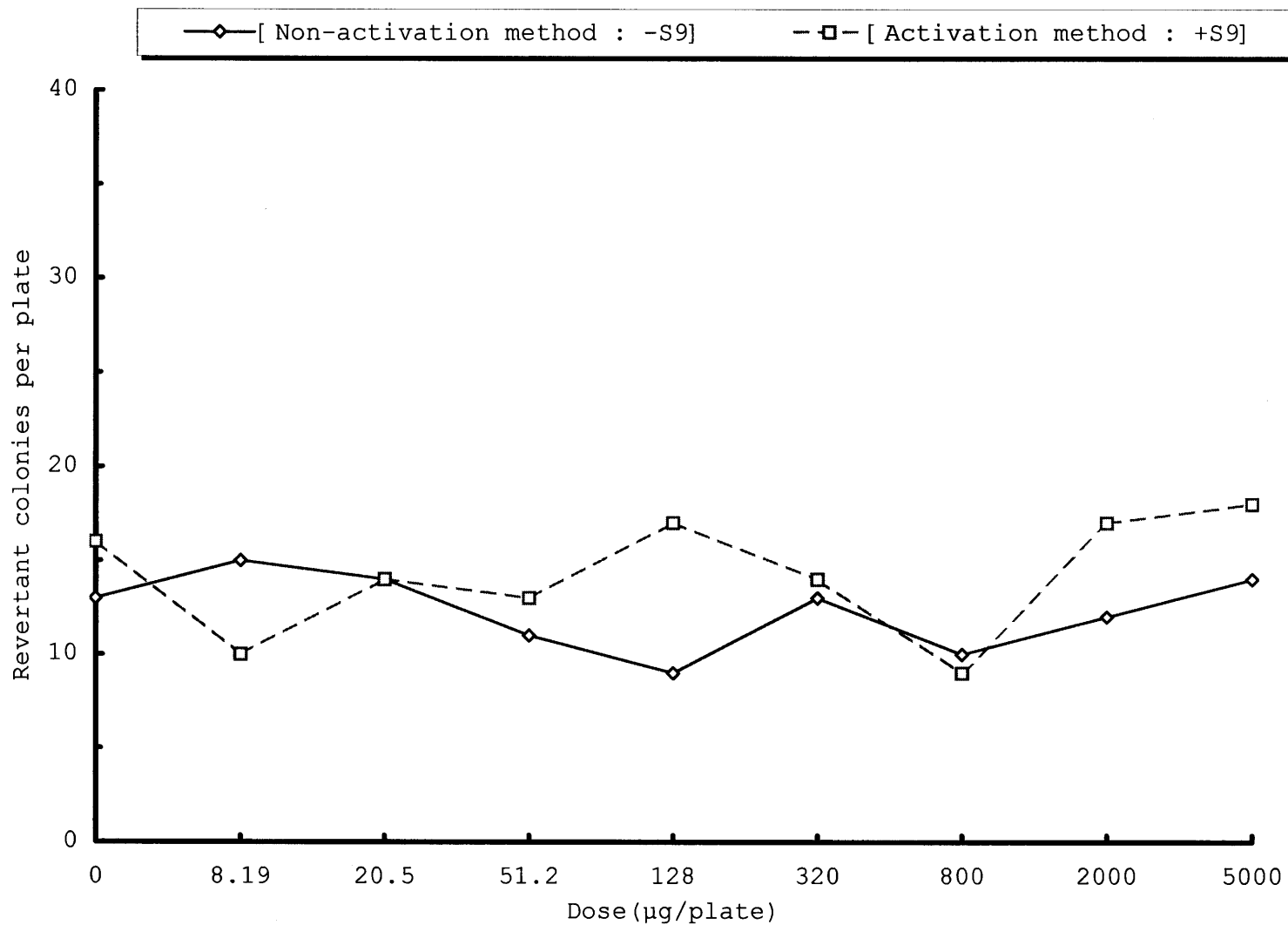


Figure 2. Dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]bis-,hexasodium salt in strain TA1535

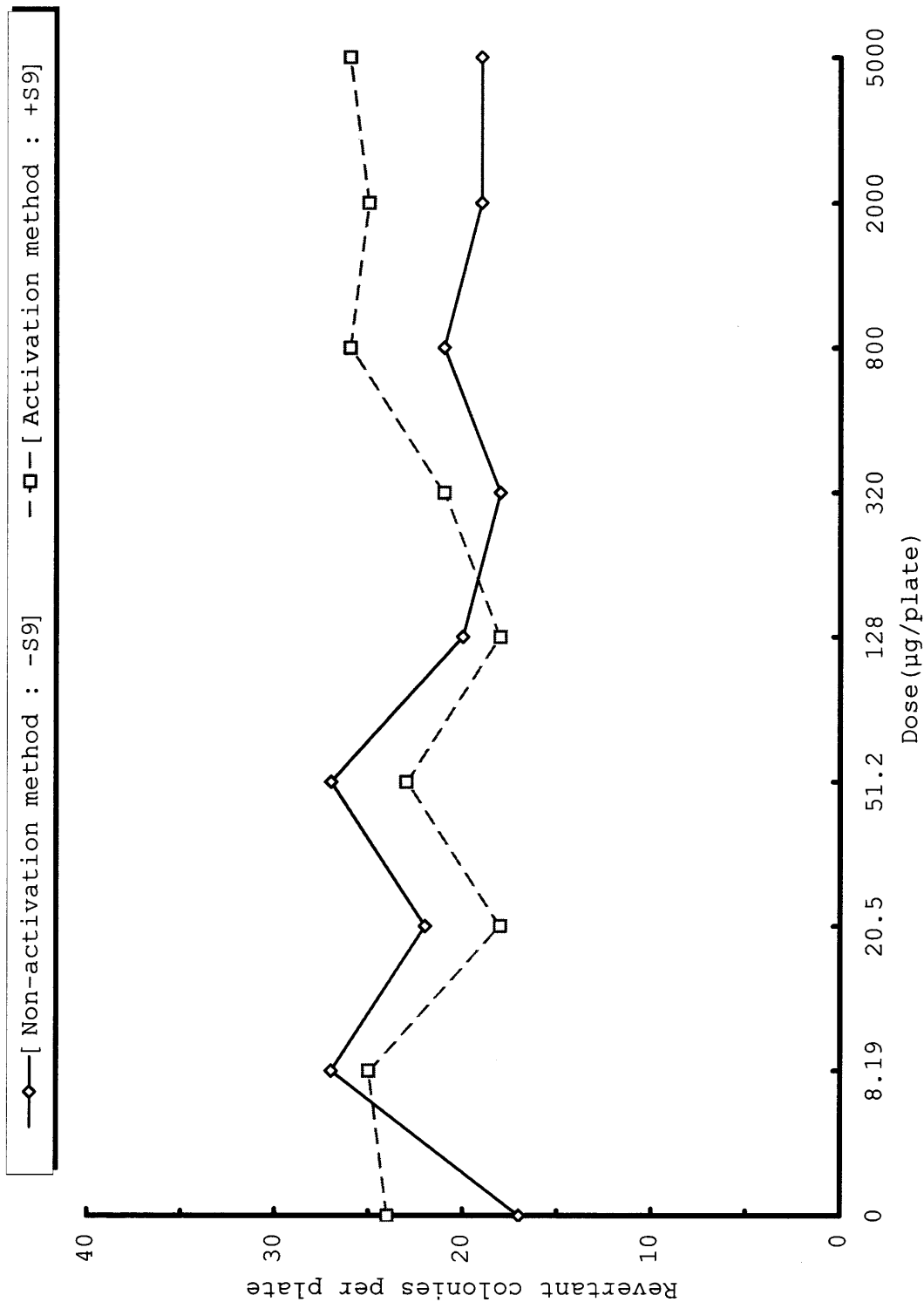


Figure 3. Dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediyl]bis[ (3-sulfo-4,1-phenylene) imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]bis-,hexasodium salt in strain WP2 uvra

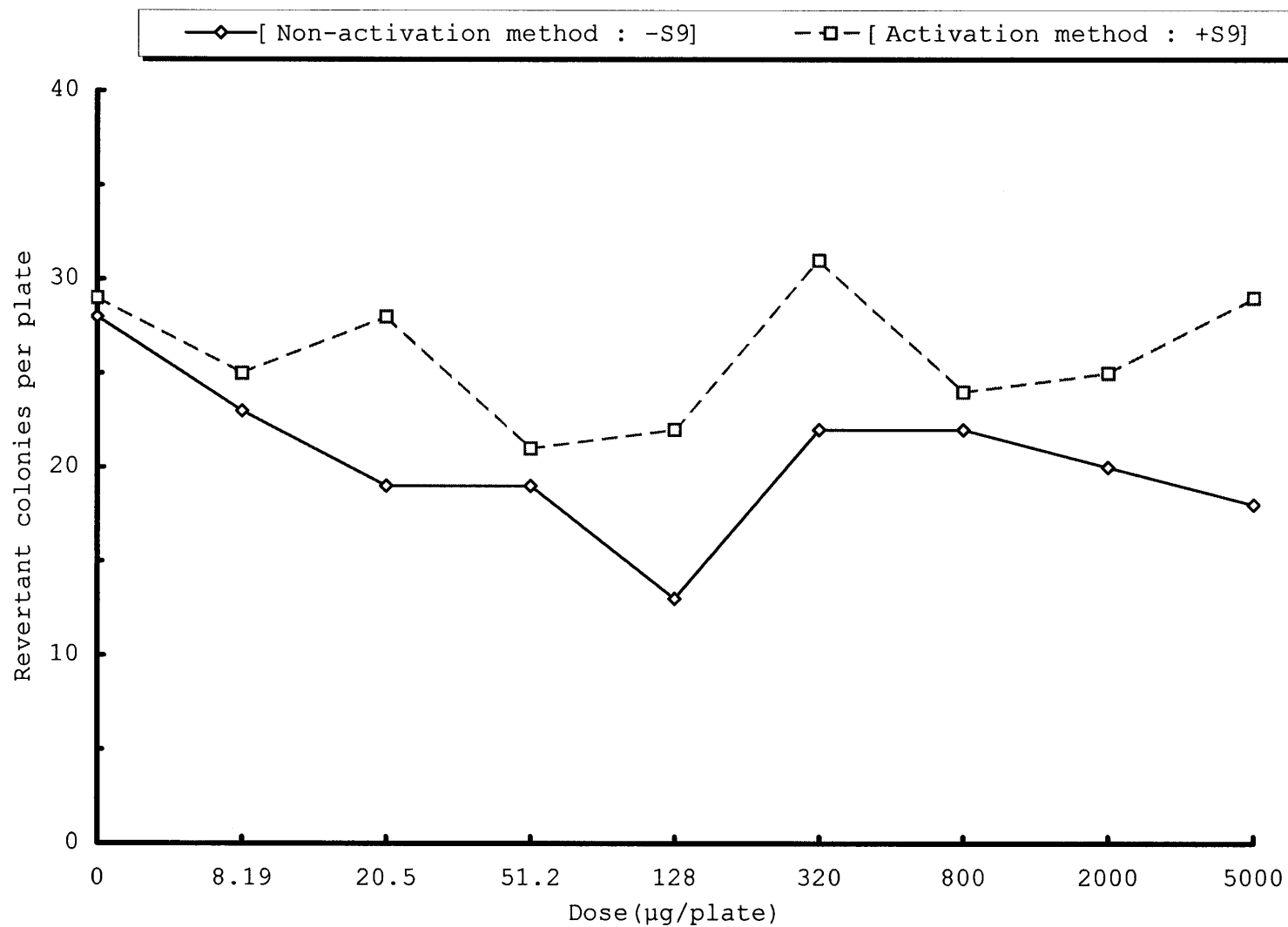


Figure 4. Dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis(3-sulfo-4,1-phenylene) imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino] bis-,hexasodium salt in strain TA98

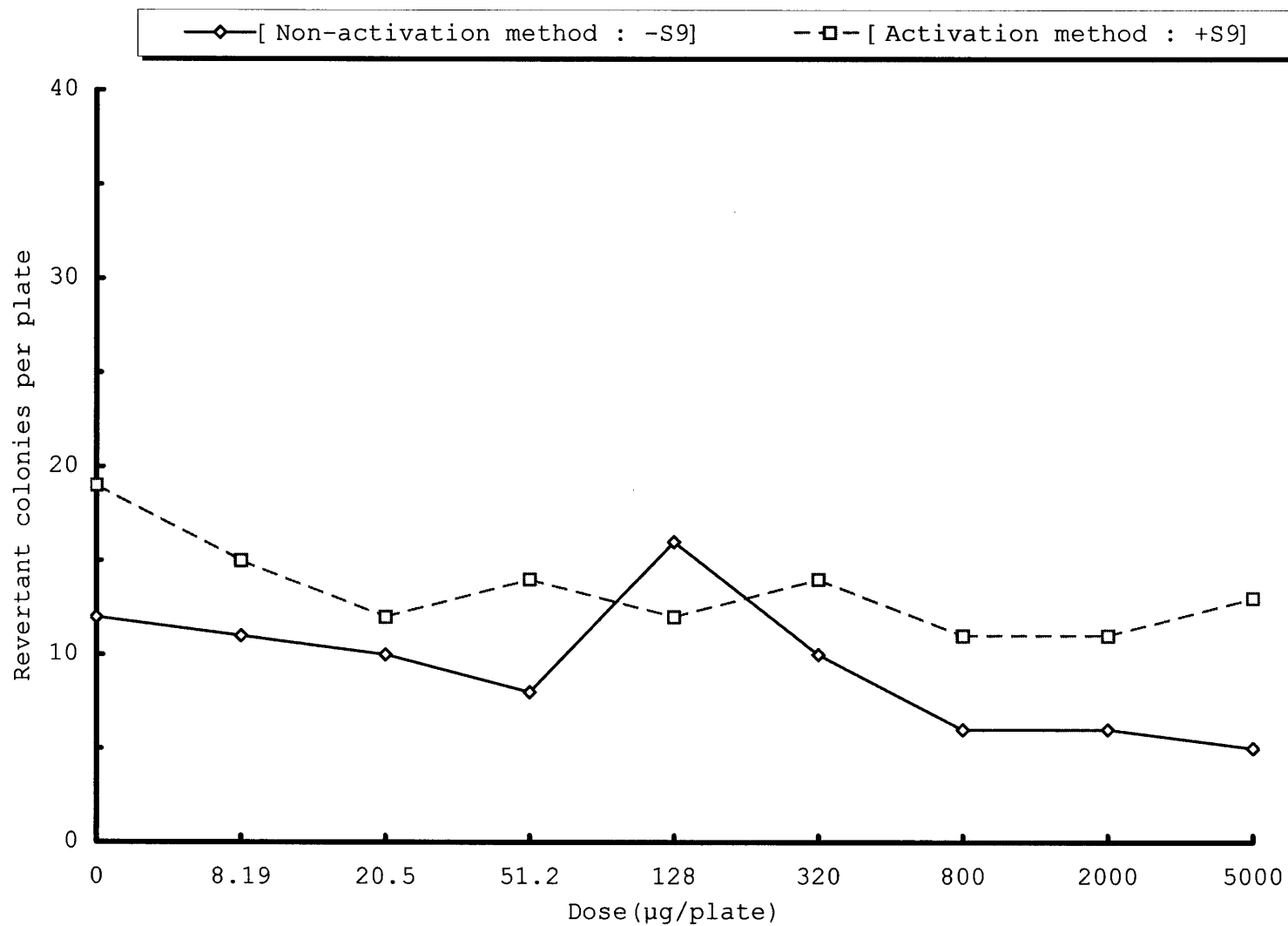


Figure 5. Dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis[ (3-sulfo-4,1-phenylene) imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]] bis-,hexasodium salt in strain TA1537

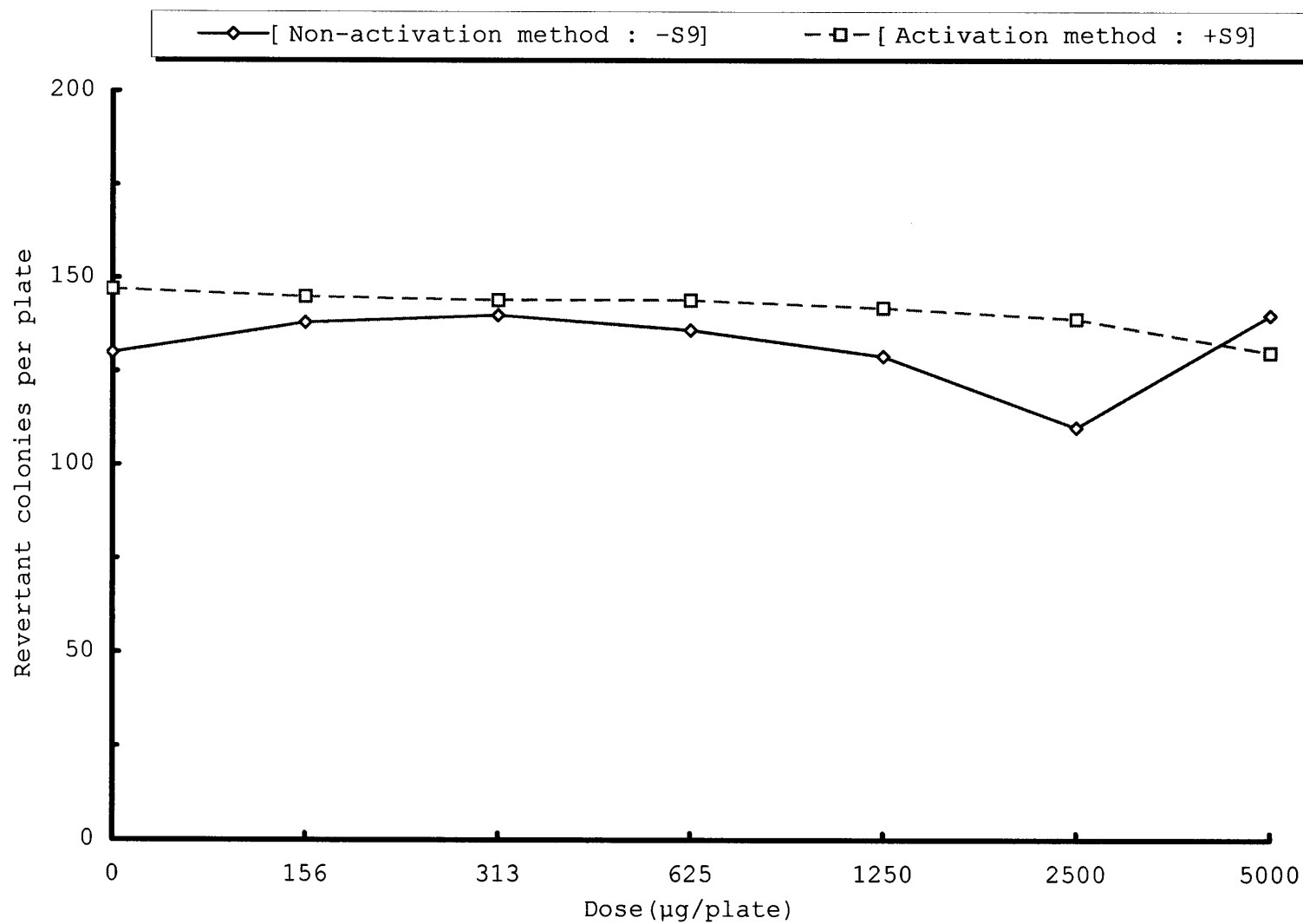


Figure 6. Bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis [(3-sulfo-4,1-phenylene) imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]] bis-, hexasodium salt in strain TA100

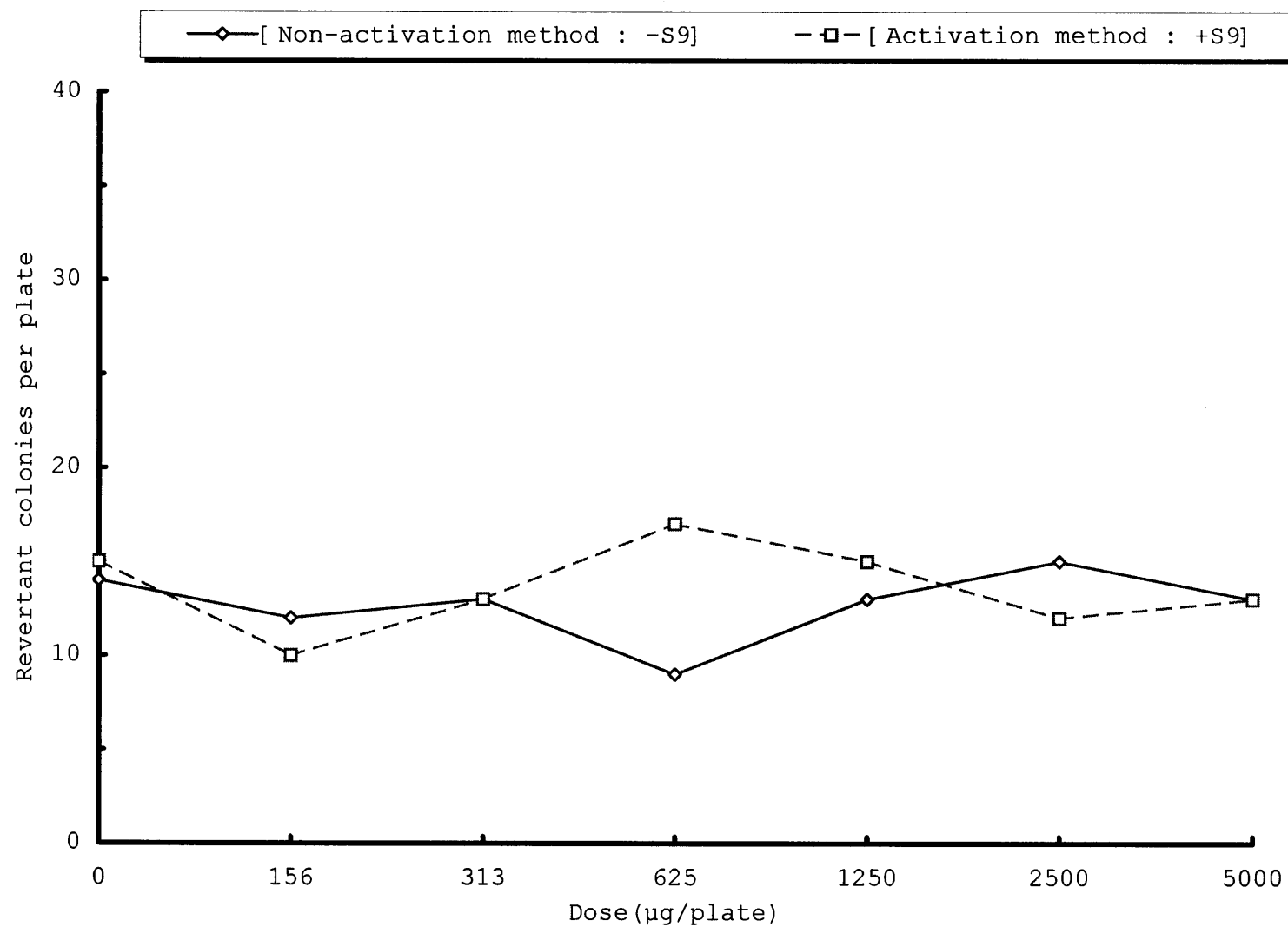


Figure 7. Bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis [(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]] bis-,hexasodium salt in strain TA1535

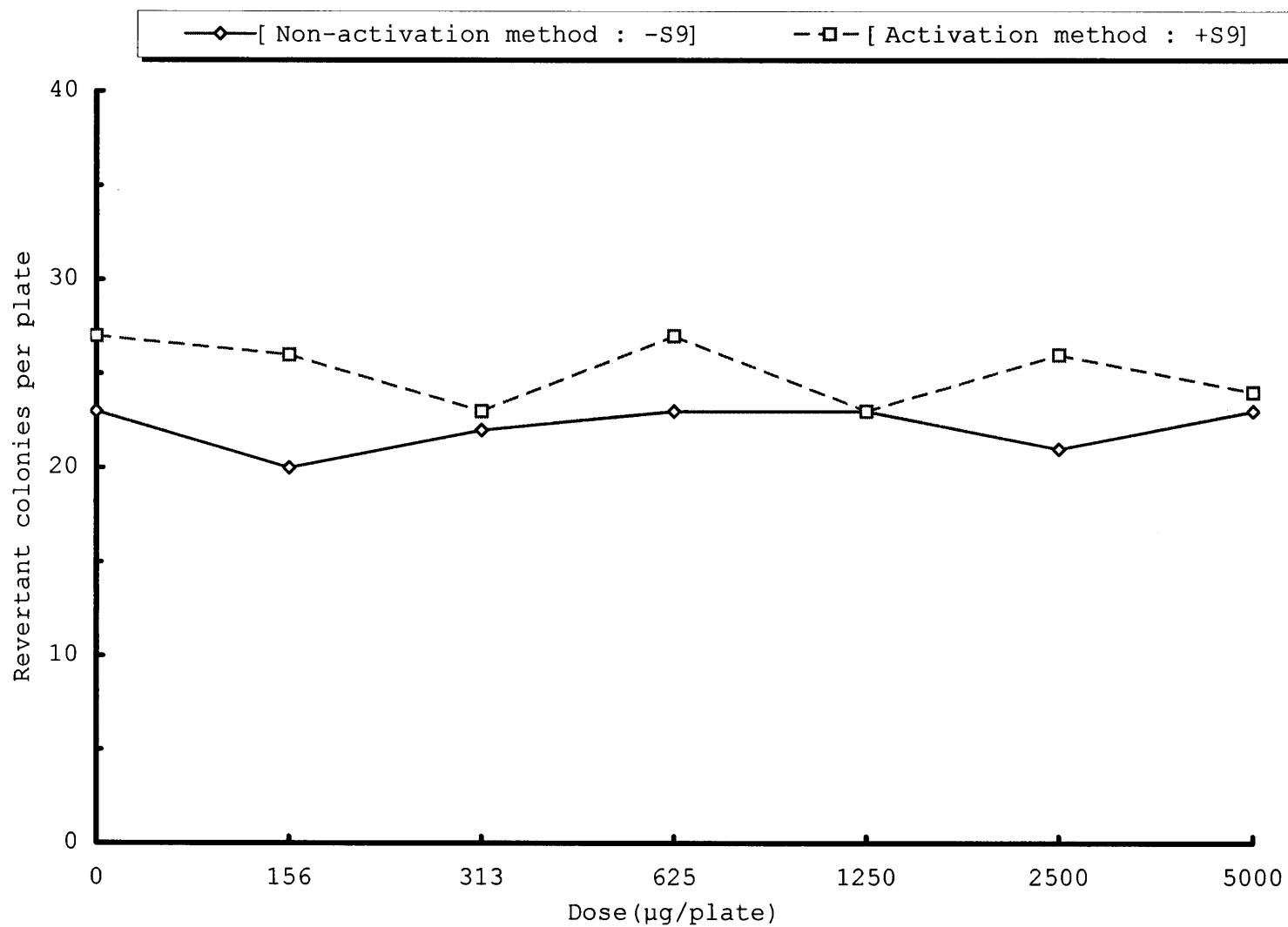


Figure 8. Bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis [(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]] bis-, hexasodium salt in strain WP2uvrA



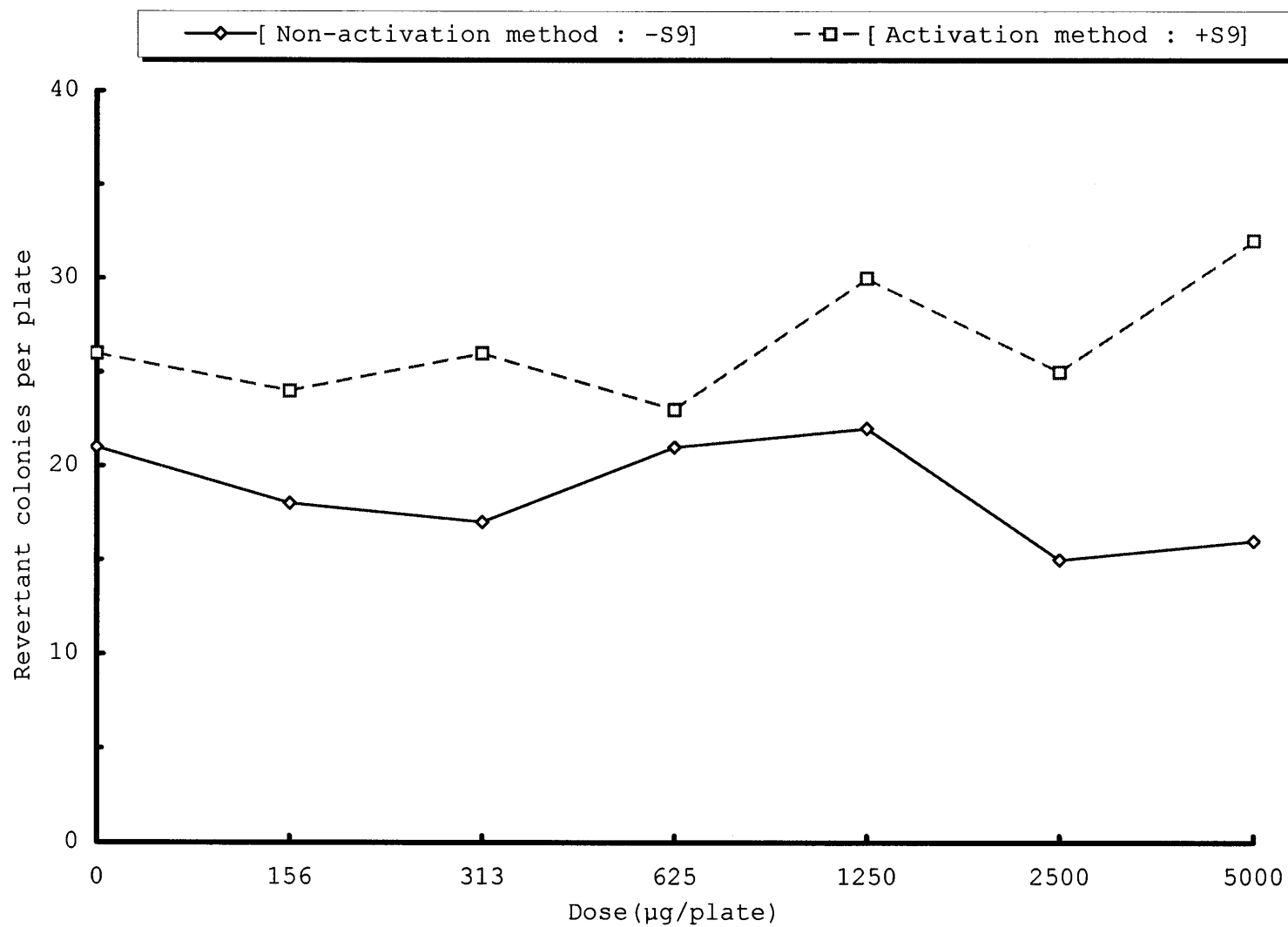


Figure 9. Bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]] bis-, hexasodium salt in strain TA98

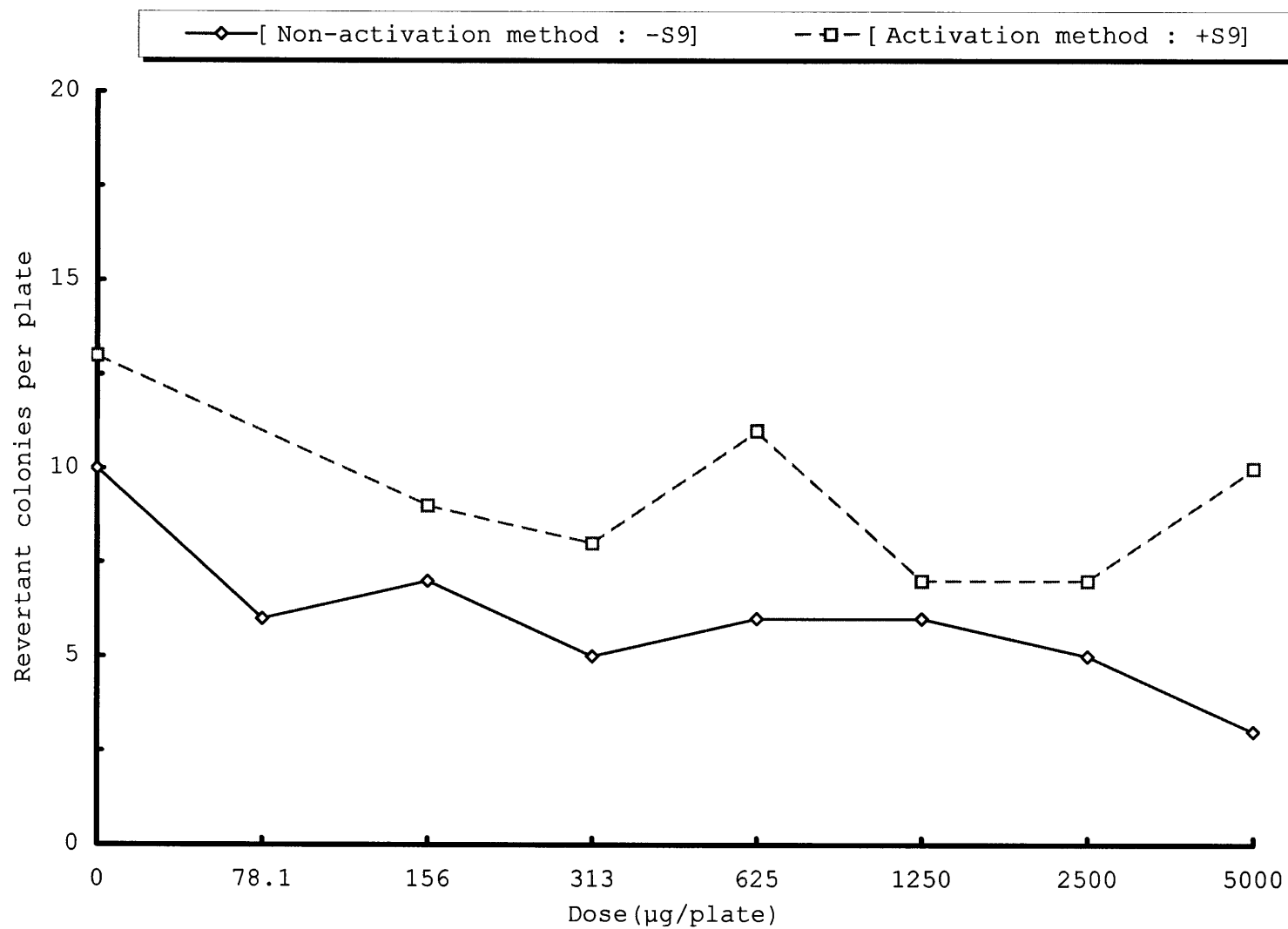


Figure 10. Bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt in strain TA1537

Table 1. Summary data on dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis[ (3-sulfo-4,1-phenylene) imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]] bis-,hexasodium salt  
[ Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [ Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis[ (3-sulfo-4,1-phenylene) imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]] bis-,hexasodium salt	0 a)	140 [ 135	142 ±	123 10]	13 [ 13	16 ±	11 3]	19 [ 17	17 ±	15 2]	30 [ 28	24 ±	30 3]	8 [ 12	13 ±	14 3]
	8.19	139 [ 127	128 ±	114 13]	18 [ 15	16 ±	12 3]	29 [ 27	30 ±	21 5]	16 [ 23	30 ±	23 7]	14 [ 11	8 ±	10 3]
	20.5	120 [ 125	130 ±	124 5]	14 [ 14	11 ±	17 3]	21 [ 22	16 ±	28 6]	21 [ 19	17 ±	20 2]	9 [ 10	12 ±	8 2]
	51.2	138 [ 132	128 ±	131 5]	9 [ 11	12 ±	13 2]	23 [ 27	28 ±	30 4]	23 [ 19	16 ±	17 4]	6 [ 8	8 ±	11 3]
	128	105 [ 113	111 ±	123 9]	8 [ 9	8 ±	12 2]	20 [ 20	17 ±	24 4]	12 [ 13	13 ±	13 1]	14 [ 16	20 ±	15 3]
	320	111 [ 116	102 ±	136 18]	10 [ 13	16 ±	12 3]	14 [ 18	14 ±	25 6]	25 [ 22	17 ±	25 5]	11 [ 10	7 ±	13 3]
	800	119 [ 102	97 ±	90 15]	8 [ 10	10 ±	12 2]	23 [ 21	18 ±	23 3]	26 [ 22	20 ±	20 3]	7 [ 6	6 ±	6 1]
	2000	122 [ 119	108 ±	128 10]	7 [ 12	13 ±	15 4]	17 [ 19	24 ±	16 4]	18 [ 20	19 ±	24 3]	6 [ 6	6 ±	7 1]
5000	127 [ 118	114 ±	112 8]	15 [ 14	13 ±	13 1]	21 [ 19	16 ±	20 3]	24 [ 18	12 ±	17 6]	5* [ 5	4* ±	6* 1]	
Positive control		860 [ 842	817 ±	850 b) 23]	451 [ 469	475 ±	481 c) 16]	149 [ 147	140 ±	151 b) 6]	651 [ 683	678 ±	721 d) 35]	267 [ 227	216 ±	197 e) 36]

a): Negative control (Distilled water, 100 µL/plate)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate      c): NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate      e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

\* : Growth inhibition was observed.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt  
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt	0 a)	109 [ 125	142 ± 17]	125 [ 16	12 ± 6]	22 [ 24	13 ± 6]	30 [ 24	23 ± 6]	19 [ 29	27 ± 3]	32 [ 19	27 ± 3]	26 [ 19	18 ± 7]	13 [ 7]
	8.19	140 [ 132	132 ± 8]	124 [ 10	9 ± 4]	14 [ 25	7 ± 5]	28 [ 25	28 ± 5]	19 [ 25	29 ± 5]	26 [ 15	20 ± 5]	20 [ 15	9 ± 6]	15 [ 6]
	20.5	122 [ 134	141 ± 10]	138 [ 14	12 ± 3]	14 [ 18	17 ± 7]	26 [ 18	14 ± 7]	14 [ 28	32 ± 4]	24 [ 12	27 ± 4]	10 [ 12	14 ± 2]	13 [ 2]
	51.2	133 [ 125	109 ± 14]	134 [ 13	18 ± 5]	14 [ 23	8 ± 2]	21 [ 23	24 ± 2]	23 [ 21	17 ± 4]	21 [ 14	25 ± 4]	14 [ 14	14 ± 0]	14 [ 0]
	128	134 [ 126	106 ± 17]	137 [ 17	13 ± 4]	20 [ 18	17 ± 5]	21 [ 18	21 ± 5]	13 [ 22	22 ± 5]	27 [ 12	18 ± 5]	15 [ 12	8 ± 4]	14 [ 4]
	320	113 [ 126	127 ± 12]	137 [ 14	16 ± 3]	14 [ 21	11 ± 1]	21 [ 21	20 ± 1]	22 [ 31	25 ± 9]	27 [ 14	41 ± 9]	14 [ 14	17 ± 4]	10 [ 4]
	800	124 [ 126	128 ± 2]	125 [ 9	9 ± 4]	13 [ 26	6 ± 5]	32 [ 26	22 ± 5]	24 [ 24	24 ± 4]	28 [ 11	20 ± 4]	10 [ 11	13 ± 2]	9 [ 2]
	2000	110 [ 120	115 ± 13]	134 [ 17	21 ± 4]	14 [ 25	17 ± 3]	22 [ 25	28 ± 3]	26 [ 25	32 ± 6]	21 [ 11	21 ± 6]	7 [ 11	12 ± 4]	15 [ 4]
5000	114 [ 110	97 ± 12]	119 [ 18	20 ± 4]	13 [ 26	20 ± 3]	29 [ 26	27 ± 3]	23 [ 29	29 ± 4]	25 [ 13	32 ± 4]	15 [ 13	12 ± 2]	13 [ 2]	
Positive control		908 [ 935	964 ± 28]	934 b)	363 [ 365	358 ± 8]	373 c)	635 [ 589	588 ± 46]	544 d)	371 [ 394	418 ± 24]	394 e)	158 [ 168	189 ± 19]	156 c)

a): Negative control(Distilled water, 100 µL/plate)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 µg/plate c):2-AA, 2 µg/plate d):2-AA, 10 µg/plate e):2-AA, 0.5 µg/plate

Table 3. Summary data on bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis [(3-sulfo-4,1-phenylene) imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]] bis-,hexasodium salt [ Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [ Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene) imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]] bis-,hexasodium salt	0 a)	138 [ 130	127 $\pm$	125 7]	17 [ 14	12 $\pm$	12 3]	27 [ 23	21 $\pm$	21 3]	16 [ 21	21 $\pm$	25 5]	10 [ 10	7 $\pm$	12 3]
	78.1													5 [ 6	6 $\pm$	7 1]
	156	138 [ 138	128 $\pm$	147 10]	9 [ 12	14 $\pm$	12 3]	24 [ 20	19 $\pm$	16 4]	22 [ 18	13 $\pm$	18 5]	7 [ 7	8 $\pm$	6 1]
	313	126 [ 140	155 $\pm$	138 15]	14 [ 13	12 $\pm$	14 1]	25 [ 22	22 $\pm$	19 3]	21 [ 17	15 $\pm$	14 4]	4 [ 5	6 $\pm$	4 1]
	625	135 [ 136	139 $\pm$	135 2]	7 [ 9	11 $\pm$	10 2]	16 [ 23	27 $\pm$	25 6]	17 [ 21	19 $\pm$	26 5]	5 [ 6	6 $\pm$	6 1]
	1250	131 [ 129	130 $\pm$	127 2]	17 [ 13	13 $\pm$	8 5]	19 [ 23	31 $\pm$	20 7]	26 [ 22	23 $\pm$	16 5]	5 [ 6	7 $\pm$	6 1]
	2500	93 [ 110	130 $\pm$	108 19]	13 [ 15	14 $\pm$	19 3]	20 [ 21	25 $\pm$	19 3]	16 [ 15	17 $\pm$	13 2]	6 [ 5	4 $\pm$	5 1]
	5000	149 [ 140	144 $\pm$	128 11]	13 [ 13	14 $\pm$	13 1]	30 [ 23	21 $\pm$	17 7]	14 [ 16	15 $\pm$	18 2]	5 [ 3	2 $\pm$	3 2]
Positive control		877 [ 897	882 $\pm$	933 b) 31]	530 [ 526	502 $\pm$	546 c) 22]	149 [ 134	130 $\pm$	122 b) 14]	758 [ 753	695 $\pm$	805 d) 55]	229 [ 306	362 $\pm$	326 e) 69]

a): Negative control (Distilled water, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Summary data on bacterial reverse mutation test of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt [Activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt	0 a)	157 [ 147	139 $\pm$	146 9]	15 [ 15	15 $\pm$	16 1]	24 [ 27	31 $\pm$	25 4]	24 [ 26	32 $\pm$	22 5]	10 [ 13	16 $\pm$	12 3]
	156	147 [ 145	138 $\pm$	151 7]	7 [ 10	10 $\pm$	13 3]	24 [ 26	25 $\pm$	28 2]	24 [ 24	20 $\pm$	28 4]	9 [ 9	8 $\pm$	9 1]
	313	149 [ 144	146 $\pm$	137 6]	11 [ 13	19 $\pm$	10 5]	28 [ 23	21 $\pm$	19 5]	28 [ 26	26 $\pm$	25 2]	8 [ 8	8 $\pm$	7 1]
	625	150 [ 144	145 $\pm$	137 7]	20 [ 17	15 $\pm$	15 3]	29 [ 27	24 $\pm$	27 3]	27 [ 23	19 $\pm$	22 4]	8 [ 11	11 $\pm$	13 3]
	1250	131 [ 142	164 $\pm$	131 19]	18 [ 15	13 $\pm$	13 3]	18 [ 23	21 $\pm$	31 7]	33 [ 30	27 $\pm$	29 3]	7 [ 7	7 $\pm$	8 1]
	2500	117 [ 139	160 $\pm$	140 22]	11 [ 12	11 $\pm$	13 1]	27 [ 26	24 $\pm$	28 2]	30 [ 25	20 $\pm$	25 5]	7 [ 7	9 $\pm$	5 2]
5000	137 [ 130	112 $\pm$	142 16]	14 [ 13	14 $\pm$	12 1]	19 [ 24	30 $\pm$	22 6]	27 [ 32	32 $\pm$	36 5]	8 [ 10	10 $\pm$	11 2]	
Positive control		780 [ 826	879 $\pm$	820 b) 50]	377 [ 363	347 $\pm$	364 c) 15]	606 [ 602	594 $\pm$	605 d) 7]	358 [ 343	331 $\pm$	339 e) 14]	127 [ 124	129 $\pm$	116 c) 7]

a): Negative control (Distilled water, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e): 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$